

Untersuchung zur Interkonvertierung
des Pyruvatdehydrogenasekomplexes
in Fettzellmitochondrien

1978

Sabine Bard



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552316_0039

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München



Dekan: Prof. Dr. H. Kräußlich

Referent: Prof. Dr. O.H. Wieland

Korreferent: Prof. Dr. H. Zucker

Tag der Promotion: 24. Februar 1978

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
1. Einleitung	1
2. Methoden	7
2.1 Tiermaterial	7
2.2 Verwendete Reagentien und Materialien	7
2.3 Statistik	8
2.4 In den Experimenten verwendete Puffer	8
2.5 Isolierung der Fettzellen	9
2.6 Isolierung der Mitochondrien	9
2.7 Messung des Sauerstoffverbrauches	10
2.8 Inkubation der Mitochondrien	13
2.9 Inkubationsmedium mit ATP-Falle	13
2.10 Verseifung von Palmityl-Coenzym A	13
2.11 Messung der Pyruvatdehydrogenase	14
2.12 Messung der Glutamatdehydrogenase (GluDH)	16
2.13 Messung der Adeninnukleotide	17
2.13.1 Messung von Adenosin-5- triphosphat (ATP)	17
2.13.2 Messung von Adenosin-5-diphosphat (ADP)	20
2.14 Messung des Glycerin-3-Phosphats	22
2.15 Messung des ¹⁴ C markierten Palmityl-Coenzym A	23
3. Eigene Untersuchungen	24
3.1 Funktionelle Intaktheit der Mitochondrien	24
3.2 Einfluß von Albumin auf die mitochondriale Atmungskontrolle	27
3.3 Verhalten der Pyruvatdehydrogenaseaktivität in Fettzellmitochondrien	29
3.4 Hemmung der Adeninnukleotidtranslokase mit Atractylosid	31
3.5 Hemmung der Adeninnukleotidtranslokase mit Palmityl-CoenzymA	35
3.5.1 Wirkung von Palmityl-CoA auf den Sauerstoff- verbrauch der Mitochondrien	35
3.5.2 Wirkung von Palmityl-Coenzym A auf die PDH-Inter- konvertierung und Glycerin-3-P-Bildung	38
3.5.3 Änderungen des mitochondrialen Adeninnukleotid- gehalts durch Palmityl- Coenzym A	41

1. EINLEITUNG

Das Fettgewebe spielt als Nährstoffreservoir für den Organismus eine große Rolle. Werden mehr als die zur Deckung des Bedarfs benötigten Nahrungsstoffe zugeführt, folgt eine Umwandlung des Überschusses in Triglyceride, die als Depotfett im Fettgewebe gespeichert werden. Im Bedarfsfalle, also bei Nahrungsmangel, kann dieses Fett wieder mobilisiert und dem Organismus als Substrat zur Verfügung gestellt werden.

Die Energiespeicherung in Form von Triglyceriden ist für den Organismus besonders raumsparend. So beträgt der Energiegehalt eines Gramms Fett 9,3 kcal, der eines Gramms Glykogen nur 4,1 kcal.⁽⁺⁾

Als Ort für die Umwandlung von Kohlenhydrate in Fett kommen vor allem die Leber und das Fettgewebe in Frage. Wie aus einer Vielzahl von Untersuchungen hervorgeht, spielt hierbei, wenigstens bei der Ratte, das Fettgewebe die Hauptrolle.

Abbildung 1 stellt in schematischer Form die im Fettgewebe bei der Lipogenese aus Kohlenhydraten sowie der Lipolyse ablaufenden Stoffwechselprozesse dar. Als Kohlenstoffquelle für die Umwandlung von Kohlenhydraten in Fett dient aus dem Blut aufgenommene Glukose. Die Aufnahme des Glukosemoleküls in die Fettzelle erfolgt dabei entlang einem Konzentrationsgefälle durch carrier-vermittelte, erleichterte Diffusion (1).

In sehr geringem Umfang wird im Fettgewebe Glukose in Glykogen umgewandelt. Für den Glukoseabbau stehen zwei Stoffwechselwege zur Verfügung, der Pentosephosphatweg und die Glykolyse. Während die Bedeutung des ersteren im wesentlichen in der Produktion von Reduktionsäquivalenten in Form von NADPH_2 für reduktive Biosynthesen zu sehen ist, erfolgt im letzteren unter aeroben Bedingungen ein Abbau des Glukosemoleküls zu Pyruvat, wobei durch Substratkettenphosphorylierung pro Mol Glukose 2 ATP gebildet werden. Die Glykolysekette ist an zwei Stellen eng mit der Triglyceridesynthese verbunden.

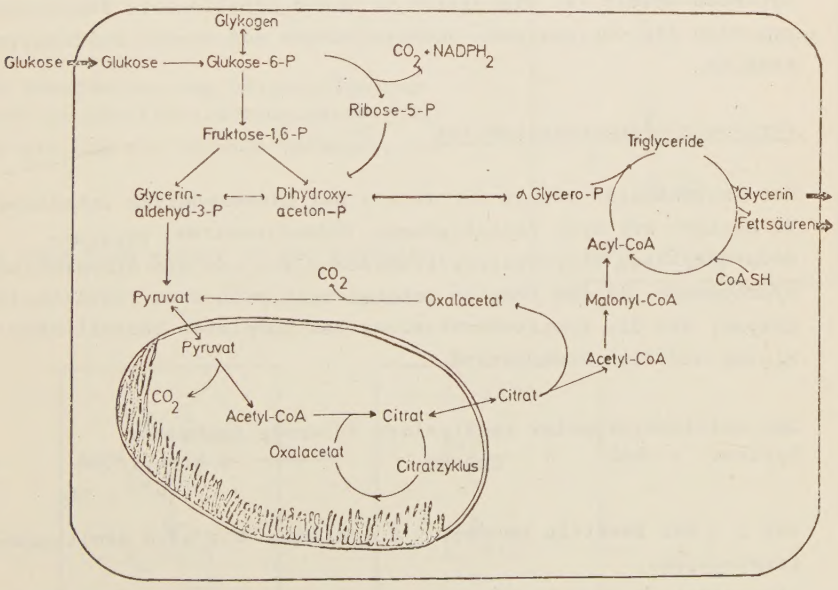
Einmal entsteht durch Reduktion des Glykolysezwischenprodukts Dihydroxyacetonphosphat Δ -Glycerophosphat, das im Falle des Fettgewebes ausschließlich den Glycerinanteil der Triglyceride stellt, da in diesem Gewebe Glycerin nicht nennenswert durch eine Glycerokinase

(+) 1 kcal = 4185,5 Joule

phosphoryliert werden kann. Der zweite Verknüpfungspunkt zwischen Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel liegt auf der Stufe des Pyruvats. Dies dient nämlich bei der Umwandlung von Kohlenhydraten in Fett als Ausgangssubstanz für die Erzeugung des für die Fettsäuresynthese benötigten Acetyl-CoA. Allerdings ist eine relativ komplizierte Sequenz von Reaktionen notwendig, bis aus cytosolischem, im Zuge der Glykolyse entstandenem Pyruvat, cytosolisches, für die Fettsäuresynthese dienendes Acetyl-CoA geworden ist.

Eingeleitet wird diese Reaktionssequenz durch den Transport des cytosolischen Pyruvats in das mitochondriale Kompartiment. Hier erfolgt die dehydrierende Decarboxylierung des Pyruvats unter Bildung von Acetyl-CoA. Für die Reaktion ist der als Pyruvatdehydrogenase bezeichnete Multienzymkomplex verantwortlich, dessen Regulierung und Funktionen weiter unten geschildert werden. Da die Fettsäuresynthese im Cytosol erfolgt, muß das mitochondriale Acetyl-CoA ins Cytosol transportiert werden.

ABBILDUNG 1 : Schematische Darstellung der Lipogenese und Lipolyse in der Fettzelle



Ein direkter Transport von Acetyl-CoA durch die mitochondriale Membran ist nicht möglich. Der Acetyl- Rest des Acetyl- CoA's kondensiert deswegen zunächst mit Oxalacetat unter Bildung von Citrat, für welches ein geeignetes Anionentransportsystem in der mitochondrialen Innenmembran existiert.

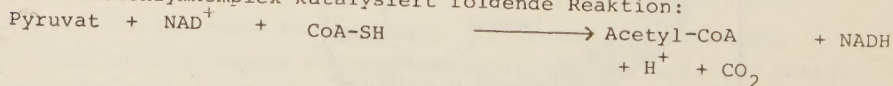
Durch die im Cytosol lokalisierte ATP-Citratlyase erfolgt nun eine Aufspaltung des Citrates in Acetyl-CoA und Oxalacetat. Während das letztere in andere Stoffwechselreaktionen eingeht, stellt das erstere die Ausgangssubstanz für die Fettsäuresynthese dar. Diese erfolgt durch die Katalyse eines weiteren Multienzymkomplexes, der Fettsäuresynthetase, die als Substrat neben Acetyl-CoA noch Malonyl-CoA benötigt. Letzteres entsteht durch biotinabhängige Carboxylierung von Acetyl-CoA durch die Acetyl-CoA-Carboxylase.

Zur Triglyceridsynthese werden die aktivierten, d.h. an Coenzym A gebundenen langkettigen Fettsäuren mit α - Glycerophosphat verestert. Da die Pyruvatdehydrogenase als geschwindigkeitsbestimmendes Enzym eine entscheidende Rolle in der Regulierung der Fettsäuresynthese spielt (s. Diskussion S. 54 und Tabelle 10), konzentrieren sich die vorliegenden Untersuchungen auf diesen Multienzymkomplex.

Pyruvatdehydrogenasekomplex

Der Enzymkomplex ist in der Matrix der Mitochondrien lokalisiert. Er besteht aus drei verschiedenen Untereinheiten: Pyruvat-decarboxylase, Dihydrolipoyltransacetylase und die Dihydrolipoyldehydrogenase. Zu dem Komplex gehören weiterhin zwei regulatorische Enzyme, die die Interkonvertierung des Komplexes beeinflussen: eine Kinase und eine Phosphatase.

Der Multienzymkomplex katalysiert folgende Reaktion:

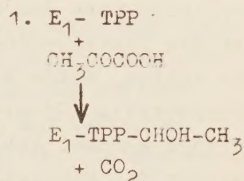


Das ΔE der Reaktion beträgt - 8 kcal/Mol. Sie wird damit praktisch irreversibel.

Die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-Coenzym A findet in folgenden Schritten statt (22):

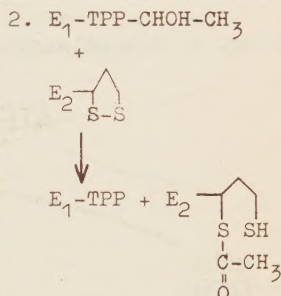
1.

Die Thiaminpyrophosphat (TPP) als Coenzym enthaltende Pyruvatdecarboxylase-Untereinheit der Pyruvatdehydrogenase (E_1) decarboxyliert Pyruvat.



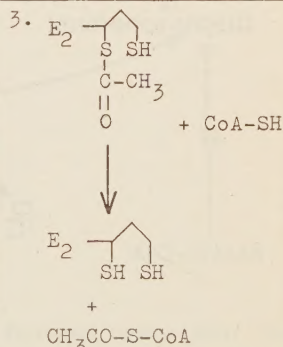
2.

Die entstehende Hydroxyäthylgruppe wird von der Pyruvatdehydrogenase durch die Transacetylase-Untereinheit (E_2) auf die Disulfidgruppe der Liponsäure übertragen, wobei die Dehydrierung zum Acetyl-Lipoat stattfindet.



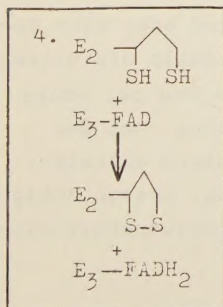
3.

Die Acetylgruppe wird auf Coenzym A übertragen, Acetyl-Coenzym A wird frei



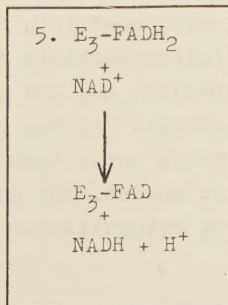
4.

Die Reoxidation des Dihydrolipoates durch Dihydrolipoyldehydrogenase (E_3) die mit FAD als Coenzym verbunden ist.



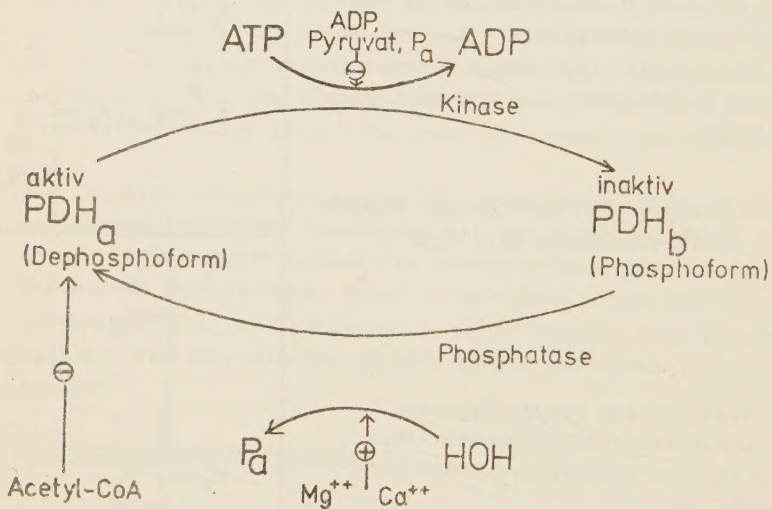
5.

Das FADH wird wieder zu FAD oxydiert.



Der Pyruvatdehydrogenasekomplex gehört zu der Gruppe der interkonvertierbaren Enzyme, deren Aktivität durch kovalente Modifikation des Enzymproteins geändert werden kann. Die phosphorylierte Form der Pyruvatdehydrogenase (PDH_b), die dephosphorylierte Form, die PDH_a , die aktive. Beide Formen können durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung mit Hilfe spezifischer Enzyme ineinander überführt werden. Abbildung 2 zeigt in schematischer Form die Grundzüge der PDH -Interkonvertierung und deren Regulation (2).

ABBILDUNG 2: Beeinflussung der Interkonvertierung der PDH



Es ist inzwischen bekannt, daß Insulin, in vitro, die PDH in Fettgewebe dadurch aktiviert, daß es die inaktive Form (PDH_b) in die aktive Form (PDH_a) überführt (3 - 13). Als Möglichkeiten zur Erklärung des Insulineffektes wurden eine direkte Hormonwirkung auf das mitochondriale PDH -System oder eine Beeinflussung des Energiestoffwechsels der Fettzelle diskutiert. Inzwischen gibt es Hinweise, daß der letztere Weg der wahrscheinlichere ist. Ausgehend von der Beobachtung, daß der ATP-Umsatz des Fettgewebes unter Insulin deutlich ansteigt, (14,15) konnte vermutet werden, daß das Hormon, dessen Fähigkeit zur Beschleunigung cytosolischer ATP-verbrauchender Bio-

synthesevorgänge lange bekannt ist, die PDH Aktivität über Änderungen des mitochondrialen ATP/ADP Quotienten modifiziert. Hinweise für die Existenz einer Beziehung zwischen dem ATP/ADP-quotienten und der PDH-Aktivität ergaben sich aus Versuchen an Lebermitochondrien (16,17) und Hepatozyten (18). In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb an isolierten Fettzellmitochondrien die Beziehungen zwischen Adeninnukleotid-Umsatz, Adeninnukleotidquotienten und PDH Interkonvertierung untersucht.

2. METHODEN

2.1. Tiermaterial:

Es wurden 150 - 180 g schwere männliche Sprague Dawley Ratten (Wiga, 8741 Sulzfeld) verwendet, die ad libitum mit Wasser und Standardlabortierfutter (57Z, Jakob ZahnII), Hockenheim) gefüttert wurden. Die Tiere kamen jeweils am Vormittag zwischen 10 und 12.00 Uhr zum Versuch und wurden durch Genickschlag getötet. Für die Experimente wurden nur die Spitzen des epididymalen Fettgewebes verwendet.

2.2 Reagentien und Materialien:

Alle Chemikalien sind von Merck, Darmstadt mit dem Reinheitsgrad pro analysi, alle Biochemikalien von Boehringer, Mannheim mit folgenden Ausnahmen:

Rinderserumalbumin von Serva, Heidelberg

Kollagenase von Worthington Biochemical Corp. Freehold New Jersey, USA

Malat von Schuchardt, München

Palmityl-Coenzym A von Serva, Heidelberg

Atractylosid von Sigma, Chemical Company, St. Louis, USA

^{14}C Palmityl CoA von New England Nuclear, NEN Chemicals GmbH
6072 Dreieichenhain, Siemensstr. 1

Permablend III von Packard Instrument International S.A.
Zürich, Schweiz

Palmitylchlorid von Fluka (Buchs, Schweiz)

Arylaminacetyltransferase wurde aus Taubenleber nach der Methode von Tabor hergestellt (19,20).

Pyruvatdehydrogenase Phosphatase wurde von Dr. Siess (Forschergruppe Diabetes) zur Verfügung gestellt, präpariert aus Schweineherzen nach der Methode von Siess (21).

Palmityl-Dephospho-Coenzym A wurde von Dr. Portenhauser (Forschergruppe Diabetes) zur Verfügung gestellt.

2.3 Statistik:

Die statistischen Signifikanzen wurden durch den Wilcoxon Rangsummentest in der Modifikation von Man und Whitney (23) ermittelt.

2.4 In den Experimenten verwendete Puffer:

Puffer I: Krebs-Ringer-Puffer (24), der nur die Hälfte der angegebenen Calciumkonzentration enthält und der vor dem Versuch bei 37°C mit Carbogen (95% O₂ und 5 % CO₂) begast wird. Der Puffer enthält außerdem 2 % Rinderserumalbumin, das 24 Stunden bei 4 °C gegen Aqua destillata dialysiert wurde.

Puffer II: Der Puffer enthält statt 2 % Rinderserumalbumin 4 % und zusätzlich 1,5 mg Kollagenase/ml Puffer, sonst wie Puffer I.

Puffer III: Saccharosepuffer, der auf pH 7.4 eingestellt ist und folgende Substanzen enthält:

Saccharose	0,25	Mol/L
Glutathion reduziert	7,5	mMol/L
EDTA	2	mMol/L
Tris(hydroxymethyl)		
aminomethan-HCl	20	mMol/L
Rinderserumalbumin	2 %	

Puffer IV: KCl Puffer, der auf pH 7.4 eingestellt ist und folgende Substanzen enthält:

KCl	130	mMol/l
MgCl ₂	2	mMol/L
EDTA	2	mMol/L
KH ₂ PO ₄	2	mMol/L
Tris-HCl	5	mMol/L
Rinderserumalbumin	0,5%	

Puffer V: wie Puffer IV, nur ohne Albumin

2.5 Isolierung der Fettzellen(25,26)

Das Fettgewebe wurde in Puffer I gewaschen. Zur Isolierung der Fettzellen wurde etwa 5 g Gewebe mit einer Schere grob zerkleinert und in einem Plastikgefäß in 7 ml Puffer II inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C im Wasserbad mit einer Schüttelfrequenz von 120/Minute eine halbe Stunde.

Danach wurden die Zellen durch ein Stück Nylonstrumpf in ein Plastikzentrifugenröhrchen, das einen dünnen Plastikschlauch enthielt, filtriert und 4 mal mit Puffer I gewaschen, indem durch Zentrifugation mit 80 - 100 g in einer Zentrifuge (+) das Medium von den Zellen getrennt, der Puffer abgesaugt, sodann mit frischem Puffer I wieder aufgefüllt und vorsichtig gerührt wurde. Bei jeder Waschung wurden etwa 10ml Puffer verwendet. Nach 2 weiteren Waschungen bei 37°C in Puffer III sind die Zellen fertig zur Präparation der Mitochondrien.

2.6 Isolierung der Mitochondrien (26):

Die weitere Präparation wurde im Eisbad bei 0°C durchgeführt.

Die Zellen wurden nach der letzten Waschung mit eisgekühltem Puffer III in einen Homogenisator nach Potter-Elvehjem (++) überführt. Homogenisiert wurde zweimal bei mittlerer Stärke in 15 ml Pottergefäß, dessen Raum zwischen Stempel und Glaswand 4/100 mm betrug.

Das Homogenat wurde in ein Plastikzentrifugenröhrchen überführt und bei 3 000 g eine Minute in einer Sorvallzentrifuge (+++) zentrifugiert. Mit einer Spritze und langer Nadel wurde die mittlere Phase abgesaugt und in einem weiteren Zentrifugenröhrchen bei 10 000 g 4 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in Puffer IV aufgenommen.

(-) Hettich Rotixa, Andreas Hettich, 72 Tuttlingen

(++) Braun-Melsungen, Braun-Melsungen Aktiengesellschaft Medizin und Labortechnik, 8033 Krailling

(+++) Sorvall RC2-B, Hormuth-Vetter, 6908 Wiesloch

Nach einer weiteren Waschung mit diesem Puffer wurde das Mitochondriensediment in etwa 1 ml dieses Puffers aufgenommen und in einem Minipotter Homogenisator ⁽⁺⁾ kurz von Hand homogenisiert, so daß sich eine gleichmäßige Mitochondriensuspension ergab.

2.7. Messung des Sauerstoffverbrauches

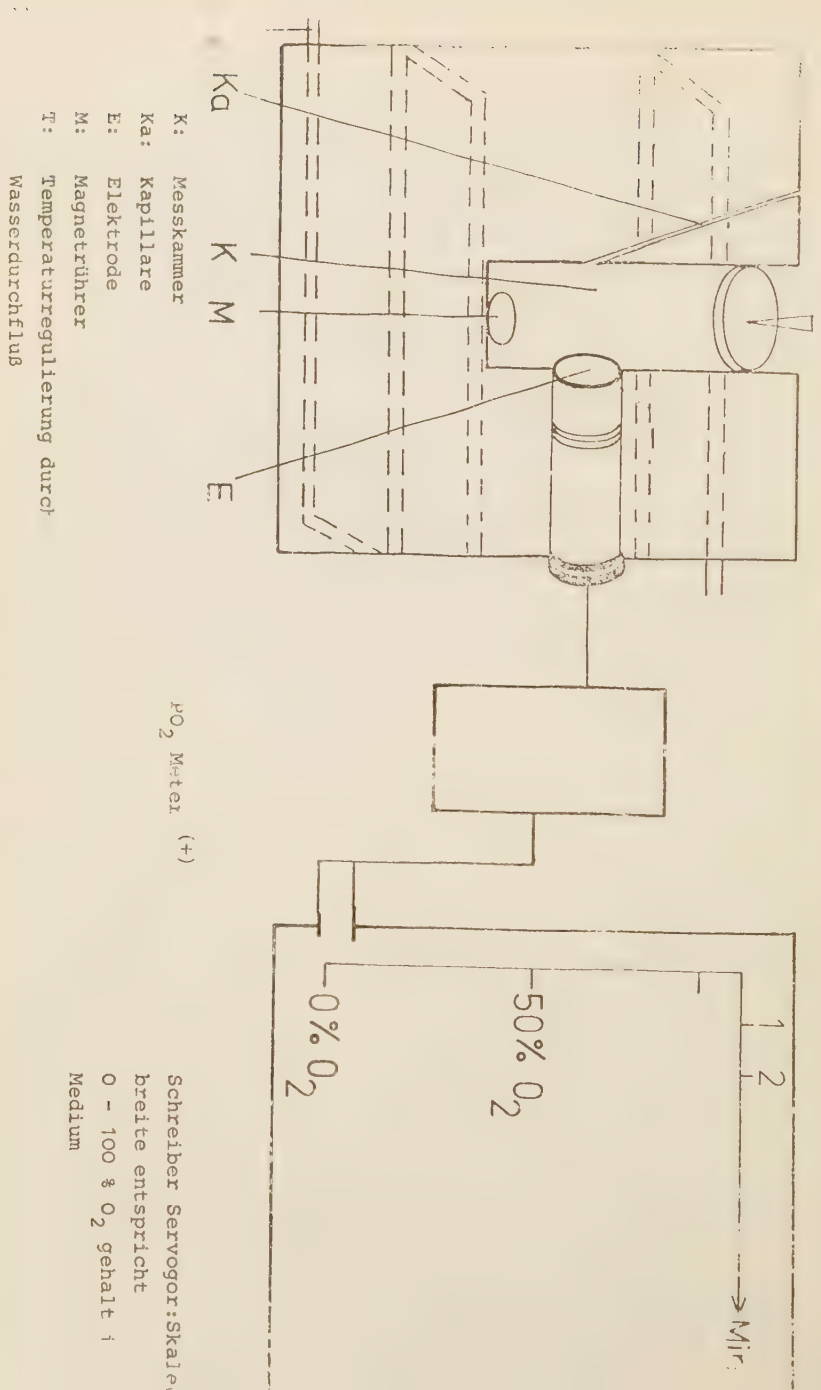
Der Sauerstoffverbrauch als Funktionsprüfung der Mitochondrien wurde mit einer Sauerstoffelektrode nach Clark (Radiometer ⁺⁺) polarographisch gemessen. Die Mitochondriensuspension wurde in eine Sauerstoffmesskammer gebracht, die auf 25 °C erwärmt wurde, etwa 100 µl der Mitochondriensuspension auf 1 ml Puffer V.

Die Suspension wurde von der Luft mit einem Plastikdeckel abgeschlossen und einem Magnetrührer leicht gerührt. In Abbildung 3 ist die Versuchsanordnung der Sauerstoffmessung dargestellt.

(+) Braun-Melsungen, Braun-Melsungen Aktiengesellschaft Medizin- und Labortechnik, 80 33 Krailling

(++) Radiometer, Kopenhagen

... schematische Darstellung der Sauerstoffmessung



- K: Messkammer
- Ka: Kapillare
- E: Elektrode
- M: Magnetrührer
- T: Temperaturregulierung durch Wasserdurchfluß

Schreiber Servogor: Skalen
breite entspricht
0 - 100 % O_2 gehalt
Medium

*) gebaut von Sonderforschungsbereich 5, d. Universität, 8 München 2, Goethestr. 33 Abt. Elektrochemie

Auf dem Schreiber entspricht die Skaleneinteilung von 0% bis 100 % der Sauerstoffspannung zwischen einer gesättigten Natriumsulfitlösung (0%) und dem Sauerstoffgehalt im Medium (100 %). Gemessen wird die Abnahme des Sauerstoffs in %/Minute.

Die Berechnung erfolgte auf einem Olivetti-Tischrechner⁽⁺⁾, dessen Programm folgende Rechnung zugrunde lag:
Zunächst wurde der Partialdruck des Sauerstoffs in der Luft (P_{O_2}) berechnet. Dabei gilt folgende Beziehung:

$$(Luftdruck - Wasserdampfdruck) \cdot 0,209 \quad \text{bei } 25^{\circ}\text{C} \quad (\text{Anteil } O_2 \text{ an Luft})$$

Da die Schwankungen beim Luftdruck und Wasserdampfdruck geringer sind als die Messfehler, wurde ein Mittelwert eingesetzt; obige Formel heißt dann:

$$(716,1 - 23,76) \cdot 0,209 = 144,699 \text{ mm Hg}$$

Der Sauerstoffgehalt im Medium wird daraus errechnet:

$$\frac{P_{O_2} \cdot \alpha \cdot Vol \cdot 1000000}{P_O \cdot 22,4} = \text{nMol } O_2$$

α : Bunsenscher Absorptionskoeffizient gibt an, wieviel ml Gas sich im ml Flüssigkeit bei einem Partialdruck von 1 Atmosphäre bei einer bestimmten Temperatur lösen.

für α gilt unter den Versuchsbedingungen: 0,0275

P_O : Standarddruck = 760 mm Hg

Um die Menge O_2 , gelöst im Medium, auszurechnen, gilt:

$$\begin{aligned} 22,4 \text{ L } O_2 &= 1 \text{ Mol} \\ 1 \text{ ml } O_2 &= \frac{1}{22,4} \text{ mMol} \end{aligned}$$

Aus dem Gesamtgehalt an O_2 läßt sich errechnen, wieviel O_2 (angegeben in nAtom O /Minute) verbraucht wurde. Als Bezugswert für den O_2 -Verbrauch der Mitochondrien wurde die Glutam-Dehydrogenase-Aktivität verwendet (s.Seite 16).

2.8 Inkubation der Mitochondrien:

Die Mitochondriensuspension wurde in Eppendorf Reaktionsgefäßen 3810 (+) bei 25 °C auf dem Thermoblock (++) inkubiert. Dazu wurden 50,ul der Mitochondriensuspension ad 0,5 ml Puffer V in die Reaktionsgefäße pipettiert, die Deckel der Gefäße blieben offen, damit eine optimale Sauerstoffversorgung der Mitochondrien gewährleistet ist. Substrate und Enzyme sind jeweils bei den Experimenten angegeben. Wenn nichts anderes angegeben, beträgt die Inkubationszeit 7 Min

Die Inkubation wurde beendet durch Abzentrifugieren in der Kälte in der Eppendorffzentrifuge 3200 (+++) bei 8000 g für eine Minute.

Mitochondriensediment und Überstand (=Inkubationsmedium) wurden durch Abpipettieren getrennt.

2.9 Inkubationsmedium mit ATP-Falle:

Dem Inkubationsmedium wird Glycerin in einer Endkonzentration von 10 mMol/L und Glycerokinase 0,25 mg/ml, die über Nacht gegen das Inkubationsmedium ohne Albumin dialysiert wurde, zugesetzt.

2.10 Verseifung von Palmityl-Coenzym A:

50,ul einer Palmityl-CoA Lösung (2 mMol) wurden mit 100,ul einer 20 mMol/L Lösung Dithioerythrit versetzt und mit 2,ul 2N KOH auf pH 12.5 eingestellt.

Auf dem Thermoblock bei 56 °C wurde 10 Minuten inkubiert.

Mit 6 % $HClO_4$ wurde wieder auf pH 7.0 eingestellt.

Das so freigesetzte CoA wurde fluorimetrisch gemessen. Es ergab sich eine 95 %-ige Verseifung.

2.11 Messung der Pyruvatdehydrogenase

Zur Messung der PDH wurden die Mitochondrien wie folgt aufgeschlossen: Nach der Trennung der Mitochondrien vom Inkubationsmedium durch Zentrifugieren wurden auf das Sediment 100 μ l 15 mM KPO_4 Puffer (2% Albumin, pH 7.0) pipettiert. Nach dem Aufwirbeln auf Whirlmix (Cenco) wurde durch zweimaliges Einfrieren und Auftauen in flüssigem Stickstoff aufgeschlossen.

Gemessen wird die PDH in der Suspension nach folgendem Prinzip (20):



Als Meßgröße wurde die durch Arylaminacetyl-Transferase katalysierte Acetylierung von p-Nitroanilin durch das im Verlauf der Reaktion gebildete Acetyl-CoA verwendet. Das p-Nitroanilin wird durch die Acetylierung farblos.

Gemessen wird die Abnahme der Absorption des p-Nitroanilins pro Minute.

Die Messung erfolgt im Eppendorf Photometer

Meßstrahlung von 405 nm

Temperatur von 25 °C

Küvettschichtdicke 1 cm

Volumen in der Küvette 250 μ l

Endkonzentrationen im Test:

KPO ₄ Puffer (pH 8.0)	25 mMol/L
p-Nitroanilid	0,15mMol/L
NAD ⁺	1 mMol/L
Thiaminpyrophosphat	1 mMol/L
Mercaptoäthanol	10 mMol/L
MgCl ₂	0,4 mMol/L
NA-Pyruvat	20 mMol/L
Laktatdehydrogenase	10 µg
Arylaminacetyltransferase	50 mU
CoA	0,1 mMol/L

Extinktionskoeffizient $\epsilon_{405} = 12 \text{ (cm}^2/\mu\text{Mol)}$

Durch die Zugabe des Coenzym A wird die Reaktion gestartet. Die Extinktionsänderung verläuft über mindestens 10 Minuten linear.

Da 1 E PDH 1 µMol p- Nitroacetanilid entspricht, das in 1 Minute gebildet wurde, gilt folgende Berechnung der PDH Aktivität:

$$\Delta E/\text{Minute} \cdot \frac{1}{12} \cdot \frac{\text{Volumen Küvette ml}}{\text{Volumen Probe ml}} = E/\text{ml}$$

Aktivierung von PDH_b zu PDH_a:

Während zur Messung der PDH_a, des aktiven Teils der PDH, die Aufschlüssuspension direkt in den Test eingesetzt wurde, war zur Messung der Gesamtaktivität der PDH die Aktivierung der katalytisch unwirksamen PDH_b notwendig. Dies geschah in einem Inkubationsansatz von 25 µl mit folgenden Zusätzen(20):

Mitochondriensuspension	20 µl
MgCl ₂	10mMol/L
Pyruvatdehydrogenasephos- phatase	6 µg

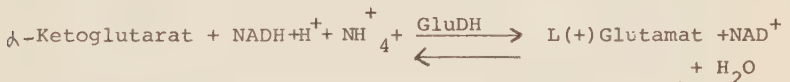
Für 25 °C wurde auf dem Thermoblock 13 Minuten inkubiert

und von der inkubierten Suspension ein Teil in den o.g. Test eingesetzt. Die Aktivität wird entsprechend der Verdünnung berechnet.

Versuche zeigten, daß unter den Versuchsbedingungen die Aktivierung nach 10 Minuten abgeschlossen war und die Werte der so aktivierten PDH über mindestens 10 Minuten nach der Aktivierung stabil blieben.

2.12 Messung der Glutamat-Dehydrogenase (GluDH):

Die GluDH ist ein spezifisches Enzym der Mitochondrien. Sie wird als Leitenzym und Bezugseinheit für die Messungen verwendet, da eine Proteinbestimmung als Bezugswert durch die hohe Albuminkonzentration in der Mitochondriensuspension nicht möglich ist. Die Messung erfolgt in der gleichen Suspension wie die PDH Bestimmung nach dem nochmaligen Einfrieren in flüssigen Stickstoff nach dem Prinzip (29):



Da das Reaktionsgleichgewicht weit auf der rechten Seite liegt, ist der Umsatz von NADH proportional zur Enzymaktivität.

Die ADP Zugabe zum Testgemisch erhöht die Enzymaktivität (29). Gemessen wird die Abnahme der Extinktion des NADH pro Minute.

Die Messung erfolgt im Eppendorf Photometer:

Meßstrahlung von 334 nm

Temperatur von 25 °C

Küvettschichtdicke 1 cm

Volumen in der Küvette 1 ml

Endkonzentrationen im Test:

Triäthanolamin (pH 7.8)	50 mMol/L
EDTA	2,5 mMol/L
NADH	0,16 mMol/L
ADP	1 mMol/L
Ammoniumacetat	100 mMol/L
α -Ketoglutarat	6,9 mMol/L

Extinktionskoeffizient $\epsilon_{334} = 6 \text{ (cm}^2/\mu\text{Mol)}$

Die Reaktion wird mit α -Ketoglutarat gestartet. Da die Abnahme der NADH Absorption über mindestens 10 Minuten linear verläuft, läßt sich die Extinktionsänderung pro Minute ablesen. Es ergibt sich folgende Berechnung:

$$\Delta E \cdot \frac{1}{6} \cdot \frac{\text{Volumen Küvette ml}}{\text{Volumen Probe ml}} = (\mu\text{M Substratumsatz/ml/min})$$

$$= (E/\text{ml})$$

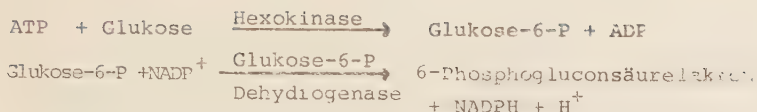
2.13 Messung der Adeninnukleotide

Zur Messung der Adeninnukleotide wird unmittelbar nach dem Beenden der Inkubation durch Abzentrifugieren (siehe oben) das Mitochondriensediment mit 100 μ l 6 % HClO_4 verrührt, in der Kälte in der Eppendorffzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und sofort mit KHCO_3 neutralisiert. Das Sediment wurde mit Aqua dest. mehrmals gewaschen, wobei nach Verrühren und Abzentrifugieren der Überstand jeweils abgenommen und neutralisiert wurde. Die gesammelten Überstände wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Da nur wenige Milligramm Mitochondrienproteine zur Bestimmung der Adeninnukleotide eingesetzt werden konnten, erwies es sich als notwendig, ATP und ADP fluorimetrisch zu bestimmen.

2.13.1 ATP-Messung:

Das hierzu benutzte Verfahren stellt eine geringe Modifikation der Bestimmung von Lamprecht und Trautschold dar. Die Messung erfolgte nach folgendem Prinzip:



Als Meßgröße wurde die Zunahme der Fluoreszenz durch das im Verlauf der Reaktion gebildete NADPH verwendet. Die Messung erfolgte im Spektrophotofluorimeter ⁽⁺⁾. Bei einer Anregungswellenlänge von 348 Nanometer wurde die Fluoreszenz bei 462 Nanometer bei Zimmertemperatur gemessen. Die Schichtdicke der Quarzküvette beträgt 1 cm, das Gesamtvolumen 2 ml.

Endkonzentrationen im Test bei pH 7.5:

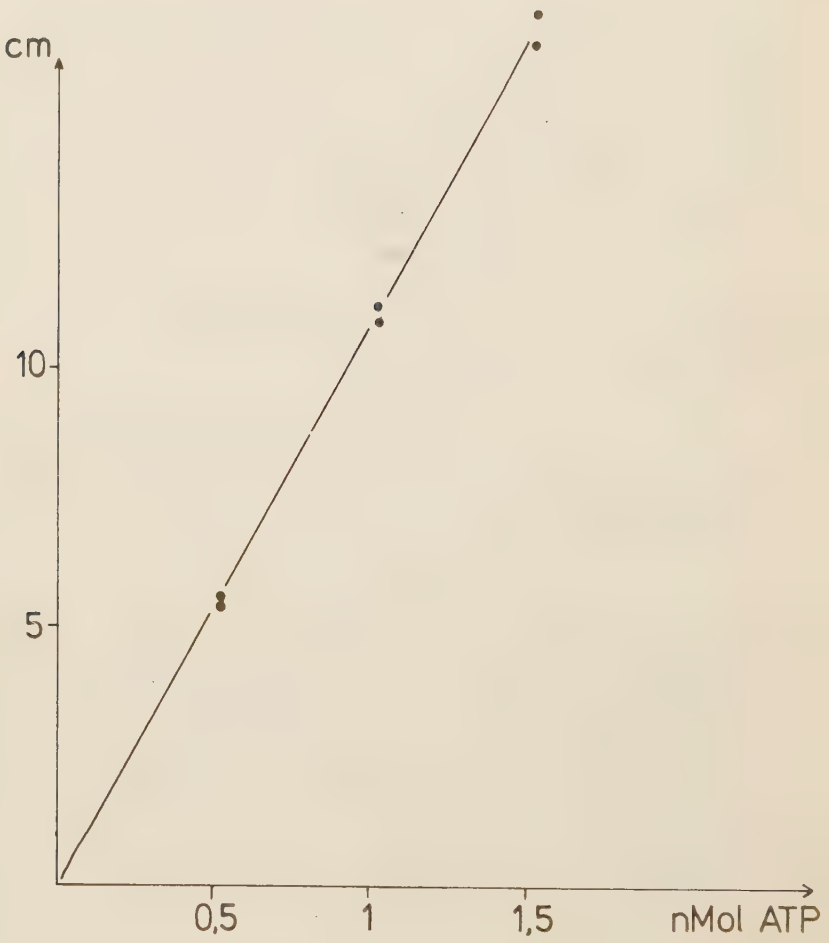
Tris- HCl	38 mMol/L
NADP ⁺	0,33 mMol/L
MgCl ₂	6,66 mMol/L
Glukose	25 mMol/L
Glukose-6-P Dehydrogenase	3,3 µg/ml
Hexokinase	13,3 µg/ml

Das Signal des Fluorometers wurde auf einen XY-Schreiber übertragen. Die Eichung erfolgte mit einer NADH-Lösung, so daß die Skalenbreite des Schreibers von 0 - 25 cm 0 - 3,5 nMol NADH₂ entsprechen.

Vor dem Start der Reaktion mit Hexokinase wurde der Ausgangswert bestimmt und danach die Zunahme der Fluoreszenz bis zum Erreichen eines konstanten Wertes registriert. Dieser war im allgemeinen nach 7 - 10 Minuten erreicht. Anhand einer Eichkurve (Abb. 4) wurde die Konzentration bestimmt. Die Konzentration der zur Eichung benutzten ATP-Lösung wurde vorher mit dem identischen Testansatz im Photometer Eppendorf bestimmt.

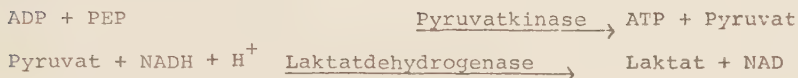
(+) Aminco-Bowman, American Instrument Company, Silver Springs, Maryland, USA

ABBILDUNG 4: Eichkurve für die Messung der ATP-Werte



2.13.2 ADP-Messung:

Die ADP-Messung erfolgte fluorimetrisch nach folgendem Prinzip (31):



Die Messung erfolgte im Spektrophotofluorimeter.
Excitationsstrahlung 348 nm und Emissionsstrahlung bei 462 nm

Zimmertemperatur

Küvettschichtdicke 1 cm

Volumen in der Quarzküvette 2 ml

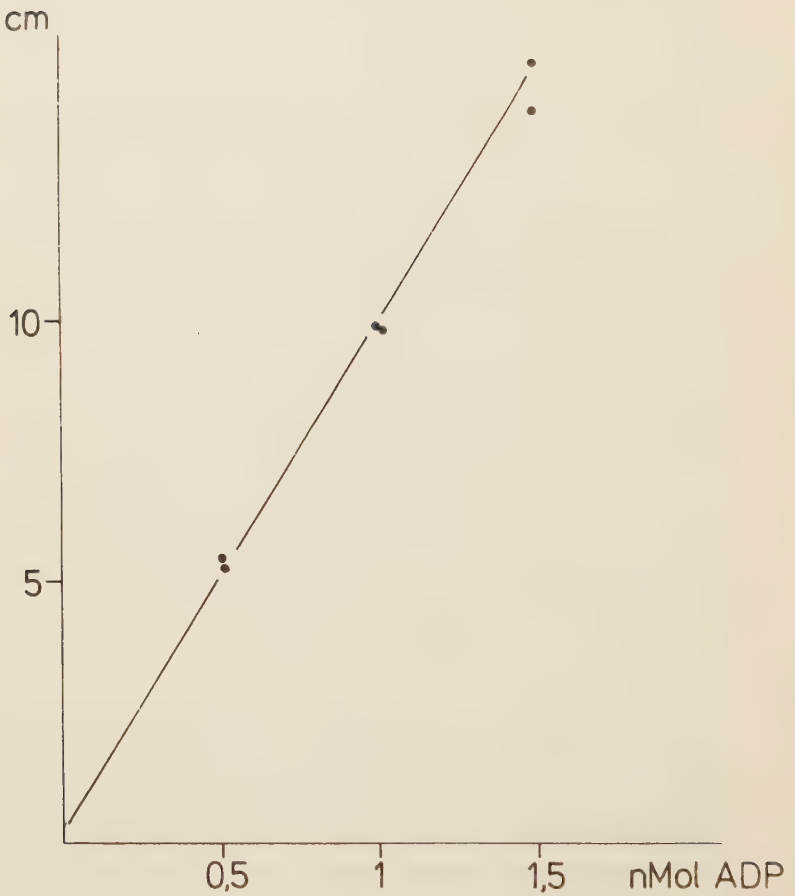
Endkonzentrationen im Test bei pH 7.5:

KPO ₄ Puffer	50 mMol/L
Phosphoenolpyruvat	0,94 mMol/L
MgSO ₄	33,8 mMol/L
KCl	0,12 Mol/L
LDH	44,6 µg/ml
NADH	2,5 nMol/Küvette
Pyruvatkinase	8,85 µg/ml

Als Meßgröße dient die Abnahme der NADH-Fluoreszenz. Die Eichung des Schreibers erfolgt wie bei der ATP-Messung. Nach Registrierung des Ausgangswertes wird die Reaktion durch Zugabe von Pyruvatkinase gestartet und die Abnahme der Fluoreszenz verfolgt. Nach 7 - 10 Minuten ist die Reaktion im allgemeinen beendet, allerdings muß zur genauen Ermittlung des Endwertes auf den Zeitpunkt 0 extrapoliert werden, da eine langsame und über die Zeit konstante Abnahme der Fluoreszenz bestehen bleibt.

Die ADP-Konzentration wurde anhand einer ADP-Eichlösung einer im Photometer Eppendorf vorher ermittelten Konzentration gemessen (siehe Abb. 5).

ABBILDUNG 5: Eichkurve für die Messung der ADP-Werte

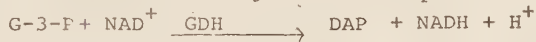


Berechnung: Aus den im Perchlorsäureextrakt ermittelten Konzentrationen von ATP und ADP wird der Adeninnukleotidgehalt der Mitochondrien ermittelt und auf Einheit GluDH bezogen.

2.14 Messung des im Überstand gebildeten Glycerin-3-Phosphat:

Die Messung erfolgte enzymatisch nach Hohorst (32).

Die Reaktion verläuft nach folgendem Prinzip:



Um eine quantitative Dehydrierung des Glycerin-3-P zu erreichen wird das Reaktionsprodukt DAP als Hydrazon abgefangen:



Gemessen wird die Extinktionszunahme des NADH.

Die Messung erfolgt im Eppendorf Spektralphotometer.

Meßstrahlung 334 nm

Temperatur von 25 °C

Küvettschichtdicke 1 cm

Volumen in Küvette 1ml

Endkonzentrationen im Test bei pH 9.5:

Glycin	0,45 mMol/L
Hydrazin	0,178mMol/L
EDTA	2,4 mMol/L
NAD ⁺	2,5 mMol/L
GDH	2,4 E /ml
Extinktionskoeffizient ϵ	= 6 (cm ² / μ Mol)

Durch die Zugabe von GDH(Glycerin-3-P-Dehydrogenase) wird nach einem Vorlauf über 3 Minuten die Reaktion gestartet. Nach 10 - 15 Minuten ist die Reaktion abgelaufen, die Extinktionsänderung wird abgelesen.

Berechnung der Konzentration des gebildeten Glycerin-3-P:

$$\begin{aligned} \frac{\text{Extinktionsänderung } (\Delta E)}{6} \cdot \frac{1}{\text{Volumen (Küvette) ml}} &= \frac{\text{Volumen (Küvette) ml}}{\text{Volumen (Probe) ml}} \\ &= (\mu\text{M/ml}) \end{aligned}$$

2.15 Messung des ^{14}C Markiertem Palmityl-CoA:

Zur Bestimmung des ^{14}C -Palmityl-CoA Gehalts des Inkubationsmediums wurde nach Abzentrifugieren der Mitochondrien 0,5 ml des Inkubationsmediums mit 0,5 ml eines Extraktionsgemisches (10 Teile Äthanol, 2 Teile 2N HCl) versetzt und von Hand gut geschüttelt. 0,5 ml dieser Lösung wurden mit 10 ml Scintillationslösung gemischt. Die Scintillationslösung hat folgende Zusammensetzung:

Permablend III	5,5 g
Naphthalin	50,0 g
Äthanol	100 ml
Äthylenglykol	20 ml
Dioxan	ad 1000 ml

Die Radioaktivität wurde in einem Tri-Carb Spectrometer (Packard Instrument, International S.A. Frankfurt) gemessen.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Funktionelle Intaktheit der Mitochondrien

Als Maß für die funktionelle Intaktheit der Mitochondrien gilt der Respiratorische Kontrollquotient (RKQ), der Aufschluß über den Grad der Koppelung der Mitochondrien gibt.

Chance und Williams (33) geben für Mitochondrien mehrere Stadien der Atmung an, die folgendermaßen charakterisiert sind:

TABELLE 1: Charakteristika der Mitochondrienatmung unter verschiedenen Bedingungen:

Status	ADP	Substrat	Atmungsgeschwindigkeit
1	niedrig	niedrig	langsam
2	hoch	niedrig	langsam
3	hoch	hoch	schnell
4	niedrig	hoch	langsam
5	keine Atmung bei Sauerstoffmangel		

Wenn der Sauerstoffverbrauch der Mitochondriensuspension bei ausreichendem Substratangebot gemessen wird, ist dieser gering, da kein oder wenig Phosphatatazeptor in Form von ADP vorliegt. Infolge der strengen Koppelung von Elektronentransport und ADP Phosphorylierung wird die Atmung durch die Zugabe von exogenem ADP beschleunigt (Übergang Status 4 in Status 3). Nach vollständigem Verbrauch von ADP verlangsamt sich die Atmung wieder (Übergang Status 3 in Status 4). Ist diese Koppelung durch eine Schädigung der Mitochondrien gestört (schlechte Präparationstechnik, Stoffwechselgifte, Entkoppler) wird der Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien nicht mehr durch die ADP-Phosphorylierung, sondern nur mehr durch die katalytische Aktivität der am Elektronenfluß beteiligten Enzyme reguliert.

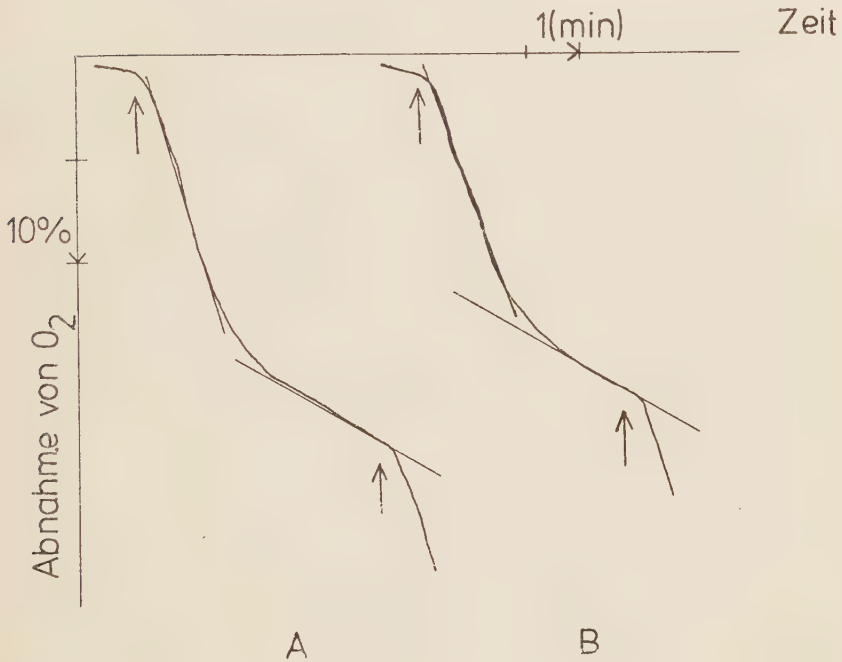
Daraus folgt: je höher der Quotient $\frac{\text{O}_2 \text{ Verbrauch Status 3}}{\text{O}_2 \text{ Verbrauch Status 4}}$ ist,

desto besser sind Atmung und Phosphorylierung gekoppelt.

Abbildung 6 zeigt das typische Verhalten des Sauerstoffverbrauchs einer Mitochondriensuspension bei den Statusübergängen 3 nach 4 und 4 nach 3. Als exogenes Substrat wurde den Mitochondrien 5 mMol/L Succinat angeboten. Der RKQ der Mitochondrienpräparation betrug zwischen 3,6 und 6,0. Auch nach einer Zeit von 90 Minuten blieb die Koppelung von Atmung und Phosphorylierung erhalten. Die nach dieser Zeit gemessenen RKQs zeigten die gleichen Werte.

ABEILDUNG 6: Messung der Atmungskontrolle bei Fettzellmitochondrien in KCl-Medium mit 0,05 % Albumingehalt und 5 mMol/L Succinat.

Bei $\longrightarrow$ erfolgt die Zugabe von $100 \mu\text{Mol/L}$ ADP.



A: Messung bei Beginn der Experimente, RKQ 4,4

B: Messung nach $1 \frac{1}{2}$ Stunden stehen der Mitochondriensuspension im Eisbad, RKQ 4,4

2 Einfluß von Albumin auf die mitochondriale Atmungskontrolle

Von verschiedenen Autoren (34, 35) wurde darauf hingewiesen, daß Albumin eine stabilisierende Wirkung auf Fettzellen und Fettzellmitochondrien ausübt. Dieser Befund konnte von uns bestätigt werden. In Abwesenheit von Rinderserumalbumin schwankte die Qualität der Mitochondrien sehr stark von Präparation zu Präparation, außerdem waren die Mitochondrien labil und blieben nicht über die ganze zum Versuch benötigte Zeit von etwa 30 Minuten intakt. Die Isolierung der Mitochondrien erfolgte deshalb in Puffern mit 0,5 % Rinderserumalbumin, die Inkubation erfolgte dann bei 0,05 % Albumin.

Die O_2 Aufnahme unterscheidet sich bei der niedrigen Albuminkonzentration nicht wesentlich von der bei völliger Abwesenheit von Albumin. Eine weitere Erhöhung der Albuminkonzentration auf 2 % führt jedoch zu einer Zunahme des O_2 Verbrauches (siehe Tabelle 2). Möglicherweise sind in dem verwendeten Albumin trotz längerer Dialyse noch oxidierbare Substrate (Fettsäuren) enthalten.

TABELLE 2: Messung des O_2 -Verbrauchs im Status 3 bei verschiedenen Albuminkonzentrationen:

Albuminkonzentrationen	ohne exogenes Substrat	mit 5 mMol/L Succinat	N
-	0,610 0,237	1.518	2
0,05 %	0,439 + 0,089 -	1,643 + 0,119 -	6
2 %	0,783 + 0,141 -	2,093 + 0,393 -	10

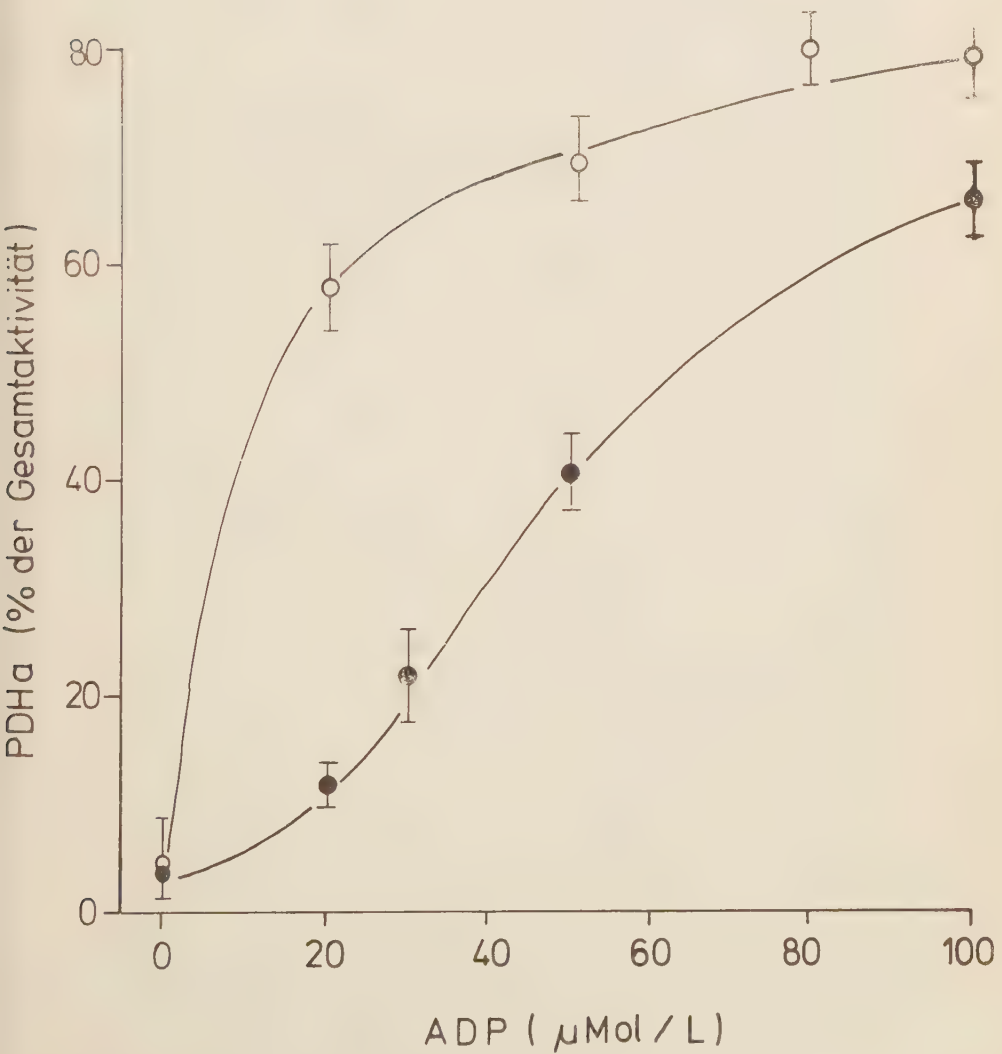
Der Verbrauch ist angegeben in $nA O / \text{min} / \text{EgluDH} \pm \text{S.E.M.}$

Verhalten der Pyruvatdehydrogenaseaktivität in Fettzell-mitochondrien:

Werden intakte Fettzellmitochondrien in Anwesenheit von Substrat 7 - 10 Minuten lang inkubiert, so beträgt die PDH_a -Aktivität nur wenige Prozent der Gesamtaktivität. Eine rasche und dosisabhängige Aktivierung der PDH läßt sich durch Zugabe von ADP in einem Konzentrationsbereich von 20 - 100 μ Mol/L erzielen. Durch Zusatz einer ATP-Falle zum Inkubationsmedium läßt sich die Kinetik der PDH-Aktivierung deutlich ändern. Mit der ATP-Falle läßt sich die Wirkung kleiner ADP-Konzentrationen auf die PDH-Aktivierung potenzieren (siehe Abbildung 7). Die in diesem Versuchsansatz bestimmbare Geschwindigkeit der Glycerin-3-Phosphatbildung ist dabei ein ungefähres Maß zur Abschätzung des intramitochondrialen Adeninnukleotidumsatzes sowie der Kapazität der Adeninnukleotidtranslokase.

ABBILDUNG 7: Dosisabhängigkeit der ADP-Wirkung auf die PDH Interkonvertierung ohne (●) und mit (○) ATP-Falle bei Fettzellmitochondrien,

N = 4-10 , $\pm$ S.E.M.



3.4 Hemmung der Adeninnukleotidtranslokase mit Atractylosid

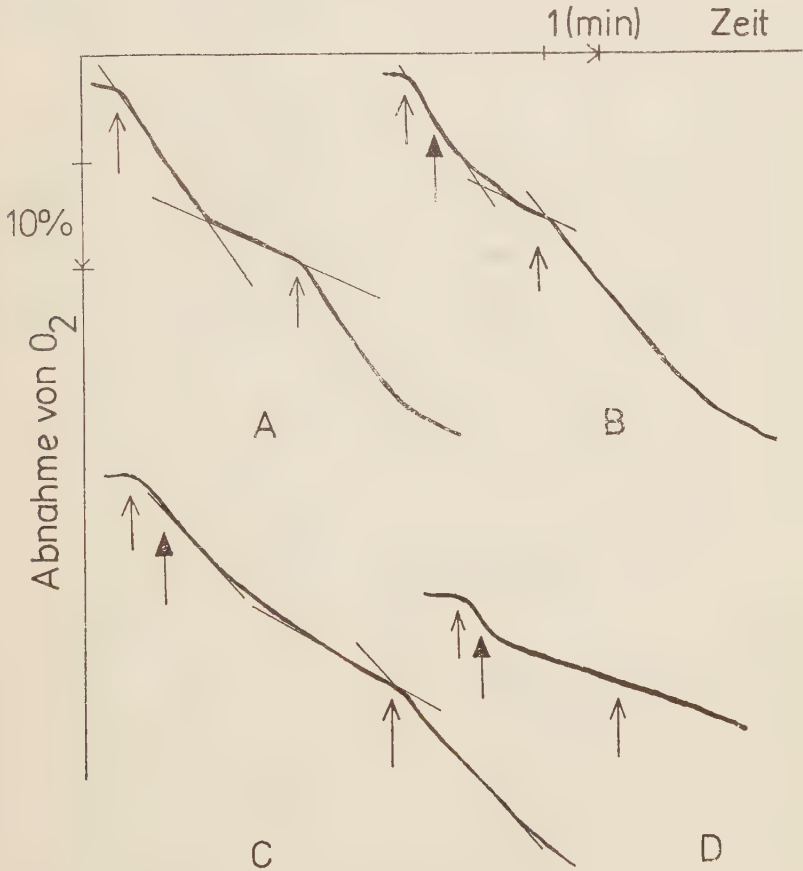
Atractylosid ist ein toxisches Glykosid aus *Atraktylis gummifera*. Wie erstmalig 1964 von Bruni et al. (36) sowie später von Klingenberg und Pfaff (37) und Pfaff et al. (38) beschrieben wurde, beruht die Wirkung des Atractylosids auf Lebermitochondrien darauf, daß es spezifisch die Adeninnukleotidtranslokation hemmt (39, 18, 11).

An Mitochondrien aus Fettzellen führt es in Anwesenheit von Succinat und ADP dosisabhängig zu einer Hemmung des Sauerstoffverbrauches und einer Verminderung des RKQ (Abbildung 8).

ABBILDUNG 8: Hemmwirkung des Atractylosid auf die Stimulierbarkeit von Fettzellmitochondrien durch ADP.

→ Zugabe von ADP 100 μ Mol/L

→ Zugabe von Atractylosid in den jeweils angegebenen Konzentrationen



A: ohne Atractylosid
C: 1 μ Mol/L Atractylosid

B: 0,5 μ Mol/L Atractylosid
D: 10 μ Mol/L Atractylosid

Daß die beobachtete Hemmung des Sauerstoffverbrauches unter der Einwirkung von Atractylosid auch an Fettzellimitochondrien auf eine Hemmung der Adeninnukleotidtranslokase zurückzuführen ist, geht aus der in Tabelle 3 zusammengestellten Daten hervor. Inkubiert man in Anwesenheit der ATP-Falle aus Glycerin und Glycerokinase, so bewirkt Atractylosid in einem Konzentrationsbereich von $0,1 - 100 \mu\text{Mol/L}$ einen Rückgang der Glycerin-3-Phosphat-Bildung auf weniger als 30 % des Ausgangswertes.

Gleichsinnig verhielt sich die PDH in der Konvertierung. Während ohne Atractylosid durch die Anwesenheit der ATP-Falle 81,8 % der Pyruvatdehydrogenase in der aktiven Form vorlagen, sank dieser Prozentsatz unter Atractylosid deutlich ab. Die Zugabe von $1 \mu\text{Mol/L}$ Atractylosid führt zu max. Hemmung des Adeninnukleotidaustritts aus den Mitochondrien. Die Pyruvatdehydrogenaseaktivität entspricht dabei den Werten, wie sie ohne Zusatz der ATP-Falle in Mitochondrien gefunden werden.

TABELLE 3: Dosisabhängigkeit der Hemmwirkung von Atractylosid auf die Translokation der Adeninnukleotide in Fettzellmitochondrien
Dem Inkubationsmedium wurden 20 μ Mol/L ADP und die ATP-Falle zugesetzt.

Atract. μ Mol/L	PDH _a in % von total	Glycerin-3-P μ Mol/E GluDH	O ₂ Aufnahme nA O/min / E GluDH
-	81,85 + 2,38	1,536 + 0,117	1,510
0,1	52,87 + 3,37	1,160 + 0,099	-
0,25	36,03 + 2,82	1,025 + 0,093	-
0,5	28,02 + 3,29	0,930 + 0,058	1,059
1,0	12,86 1,29	0,638 + 0,081	0,971
2,0	13,44 + 1,35	0,508 + 0,051	0,755
10	11,25 + 1,77	0,529 + 0,089	0,377
50	6,6	0,638	-
100	9,5	0,500	-

+ S.E.M. bei N mindestens 6, sonst Mittel aus 2 Werten

3.5 Hemmung der Adeninnukleotidtranslokase mit Palmityl-CoA

An Lebermitochondrien wurde eine atractylosidähnliche Wirkung der Coenzym A Ester langkettiger Fettsäuren beschrieben (40-42). An Herzmuskelmitochondrien konnte überdies durch Pande (43) nachgewiesen werden, daß die Hemmung der Translokase durch Acyl-CoA durch ADP Zugabe aufgehoben werden kann. Infolgedessen wurde untersucht, ob Palmityl-CoA auch an Fettzellmitochondrien zur Hemmung der Adeninnukleotidtranslokase imstande ist.

3.5.1 Wirkung von Palmityl-CoA auf den Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien

Um auszuschließen, daß die Wirkung von Palmityl-CoA in den in den Versuchen verwendeten Mengen auf einer einfachen Substratwirkung beruht, wurde zunächst der O_2 -Verbrauch der Mitochondrien mit Palmityl-CoA gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

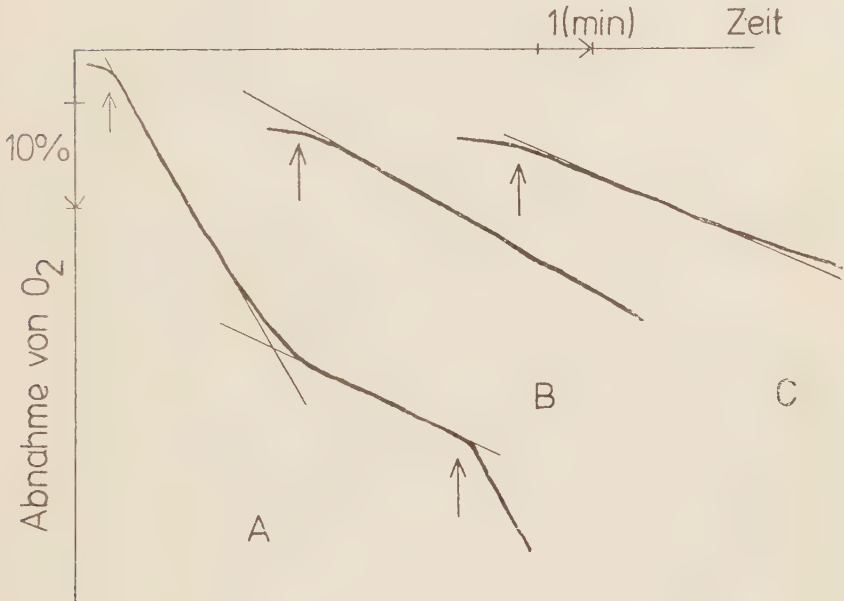
TABELLE 4: O_2 -Verbrauch von Fettzellmitochondrien ohne Substrat, mit Succinat als Substrat und mit Palmityl-CoA. Inkubation in Sauerstoffkammer wie S. 10 beschrieben. Der Verbrauch ist angegeben in $na\ O/min / E\ GluDH$.

	Kontrolle ohne Substrat	Succinat 5 mmol/L	Palmityl-CoA 20 μ mol/L
O_2 -Verbrauch	0,53	1,82	0,45

Dabei zeigte es sich, wie sowohl aus der Tabelle 4 als auch der Abbildung 9 hervorgeht, daß Palmityl-CoA von den Fettzellmitochondrien offenbar nicht oxidiert werden kann. Jedenfalls bewirkte die Zugabe von Palmityl-CoA keine Stimulierung des O_2 -Verbrauches, während Succinat durchaus dazu imstande ist.

ABBILDUNG 9: Messung der Atmungskontrolle von Fettzellmitochondrien unter den S. 10 beschriebenen Bedingungen

—————> Zugabe von 100 $\mu\text{Mol/L}$ ADP



A: Succinat 5 mMol/L

B: ohne Substrat

C: Palmityl-CoA 20 $\mu\text{Mol/L}$

Bei weiteren Untersuchungen ergab sich darüber hinaus, daß Palmityl-CoA die Oxidation anderer Substrate, wie Succinat im Status 3 hemmt (Abb. 10). Die Wirkung des Palmityl-CoA tritt dabei sehr rasch ein, wie aus Teil B der Abb. 10 hervorgeht. Sie ist bereits nach 30 Sekunden nachweisbar.

Gemessen an der O_2 -Aufnahme ist mit 20 $\mu\text{Mol/L}$ Palmityl-CoA eine vollständige Hemmung (Teil D der Abb. 10), mit 10 $\mu\text{Mol/L}$ Palmityl-CoA nur eine teilweise Hemmung der aktiven Atmung zu beobachten.

Dieses Ergebnis läßt sich leicht durch eine Hemmung des ADP-Transportes erklären.

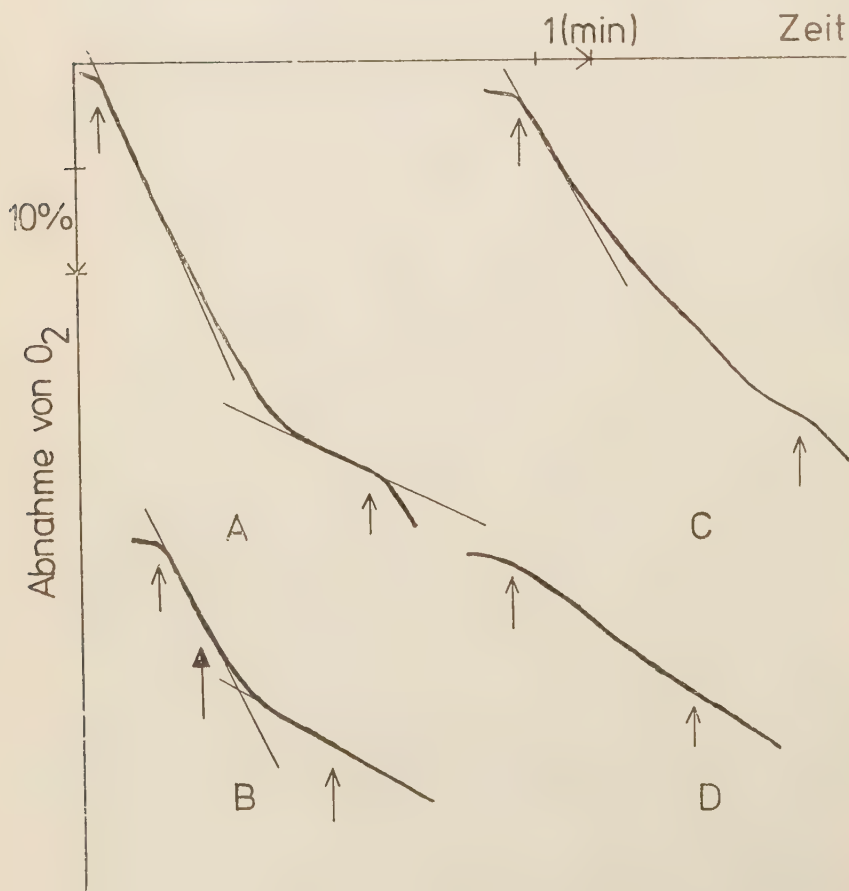
ABBILDUNG 10: Hemmung der Sauerstoffaufnahme bei Fettzellmitochondrien durch Palmityl-CoA bei Zusatz von 5 mMol/L Succinat.

→ Zugabe von 100 μ Mol/L ADP in Teil A,B,C u.D. der Abbildung

→ Zugabe von 20 μ Mol/L Palmityl-CoA in Teil B der Abbildung

Teil C: vor Versuchsbeginn Zusatz von 10 μ Mol/L Palmityl CoA

Teil D: vor Versuchsbeginn Zusatz von 20 μ Mol/L Palmityl-CoA



3.5.2 Wirkung des Palmityl-CoA auf die PDH-Interkonvertierung

Der durch Palmityl-CoA hervorgerufene Hemmung der aktiven Atmung entspricht die Beeinflussung der PDH Inverkonvertierung. In Abbildung 11 ist der Effekt von Palmityl-CoA auf die PDH Interkonvertierung dargestellt.

Inkubiert man Fettzellmitochondrien für 10 Minuten in Anwesenheit einer ATP-Falle, so liegen etwa 67 % der PDH in der aktiven Form vor. Bereits 30 Sekunden nach Zugabe von Palmityl-CoA ist der Anteil der aktiven PDH auf 20 % gesunken und bleibt wenigstens für weitere 8 Minuten so niedrig.

Die Hemmung der Adeninnukleotidtranslokase wird ebenfalls dokumentiert durch das Sistieren der Glycerin-3-P Bildung im gleichen Versuch, die in den ersten 10 Minuten der Inkubation mit der ATP-Falle von 0 auf $4,96 \mu\text{M}/\text{E GluDH}$ anstieg und nach der Zugabe von Palmityl-CoA nicht weiter zunahm, sondern nach weiteren 8 Minuten Inkubation einen Wert von $5,06 \mu\text{M}/\text{E GluDH}$ aufwies.

ABILDUNG 11: Interkonvertierung der PDH bei Fettzellmitochondrien, die in Anwesenheit der ATP-Falle inkubiert werden, durch die Einwirkung von 20 μ M/L Palmitoyl-CoA

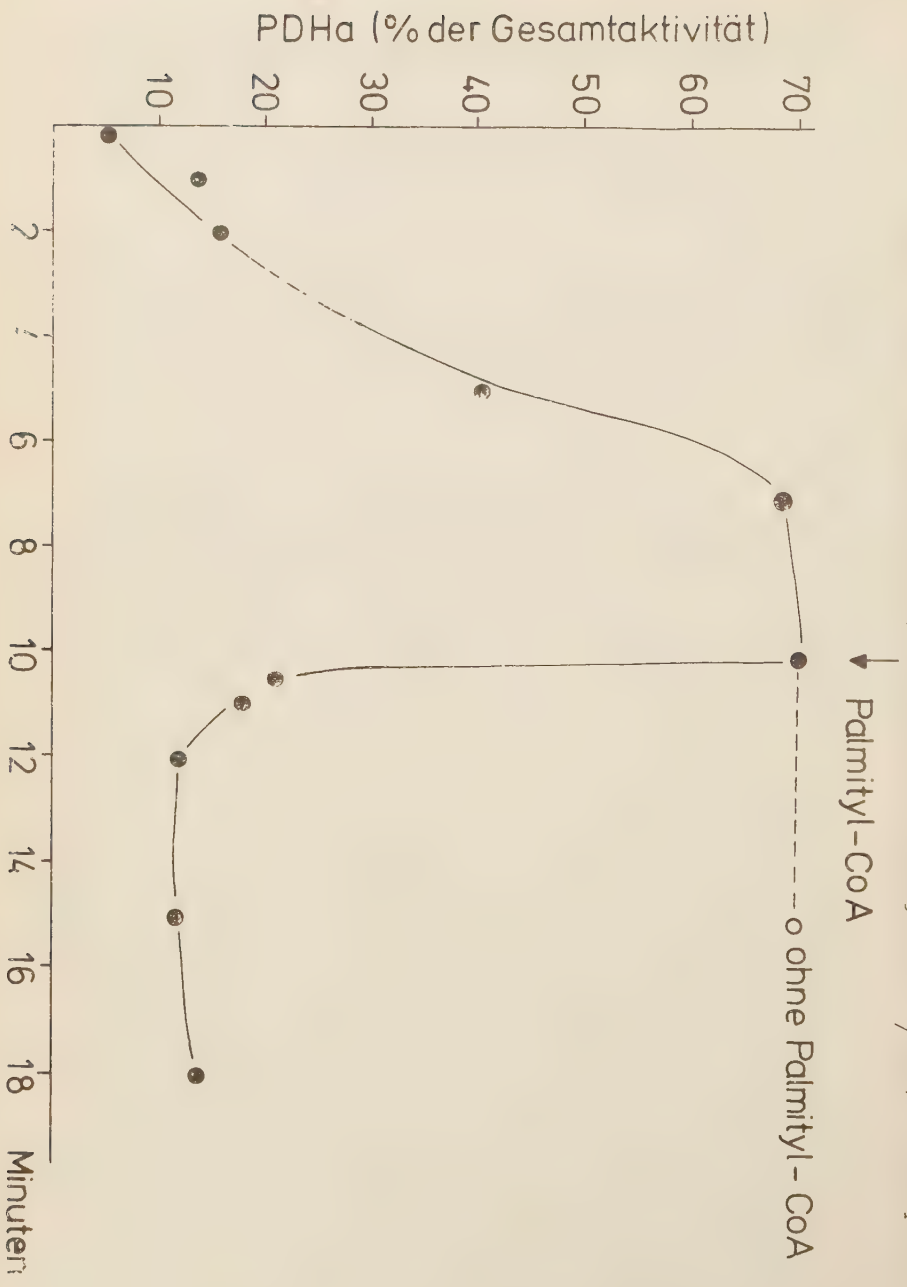


Tabelle 5 zeigt die Dosisabhängigkeit der Palmityl-CoA Wirkung auf die PDH-Interkonvertierung und die Glycerin-3-P Bildung bei isolierten Fettzellmitochondrien.

TABELLE 5: Dosisabhängigkeit der Hemmwirkung des Palmityl-CoA auf die Adeninnukleotidtranslokation bei Fettzellmitochondrien

Inkubation wie auf S.13 angegeben mit 20 μ Mol/L ADP und den Zusätzen wie in Tabelle angegeben.

	N	PDH _a i. % von total	α	Glycerin-3-P Bild. / μ M/E GluDH/ 7 Min	α
Kontrolle ohne ATP-Falle	4	11,6 $\pm$ 2,08		0	
Kontrolle mit ATP- Falle	14	59,1 $\pm$ 3,12		3,748 $\pm$ 0,089	
ATP-Falle + P.CoA 2 μ Mol/l	10	45,2 $\pm$ 3,04	+	3,637 $\pm$ 0,092	NS
5 "	11	36,7 $\pm$ 3,85	+	3,45 $\pm$ 0,119	+
10 "	6	21,9 $\pm$ 4,32	+	2,655 $\pm$ 0,244	+
20 "	7	7,2 $\pm$ 0,92	+	1,11 $\pm$ 0,187	+
50 "	1	6,9	+	0,27	
100 "	1	2,6	+	0,69	+
ATP-Falle, Succinat 5 mMol	4	4,1 $\pm$ 0,51		18,20 $\pm$ 1,959	
ATP-Falle Succinat 5 mMol/L Palmityl-CoA 20 μ Mol/L	4	3,5 $\pm$ 0,75		1,185 $\pm$ 0,244	

$\pm$ S.E. M.

α = Signifikanz zu Kontrolle mit ATP-Falle

NS= nicht signifikant

+ = $\alpha < 0.05$

In Abwesenheit von Substrat führen bereits 2 $\mu\text{Mol/L}$ Palmityl-CoA zu einer statistisch signifikanten Abnahme der PDH_a von 59 auf 45 %. Mit nur 20 $\mu\text{Mol/L}$ Palmityl-CoA konnte die durch die ATP-Falle bedingte PDH_a Zunahme vollständig verhindert werden. Überraschenderweise erwies sich die Geschwindigkeit der Glycerin-3-P Bildung als weniger empfindlich gegen Palmityl-CoA Einfluß. Hier konnte eine signifikante Hemmung erst ab 10 $\mu\text{Mol/L}$ Palmityl-CoA festgestellt werden.

Ein anderes Bild ergab sich in Anwesenheit von Succinat als exogenem Substrat. Hier ließ sich keine Wirkung von Palmityl-CoA auf die PDH Interkonvertierung feststellen, da in Anwesenheit von Succinat der prozentuale Anteil der PDH an der Gesamtaktivität trotz ATP-Falle auf dem niedrigen Wert von 4 % blieb. Deutlich fiel dagegen die Hemmung der Glycerin-3-Phosphat-Bildung aus, die von etwa 18 auf 1,2 mMol/E GluDH abnahm.

3.5.3 Änderungen des mitochondrialen Adeninnukleotidgehaltes durch Palmityl-CoA:

Die Hemmung der Glycerin-3-P Bildung durch Palmityl-CoA in Anwesenheit der ATP-Falle legte eine Störung der Adeninnukleotid-translokation durch Palmityl-CoA nahe, wie sie in Lebermitochondrien beschrieben wurde. Ein deutlicher Hinweis auf eine derartige Translokasehemmung wurde durch direkte Messung der mitochondrialen Adeninnukleotidgehalte nach Palmityl-CoA Einwirkung erbracht.

TABELLE 6: Messung der Adeninnukleotide in Fettzellmitochondrien

Die Inkubation der Fettzellmitochondrien erfolgte wie S. 13 beschrieben, mit 20 μ Mol ADP, die jeweiligen Zusätze zum Inkubationsmedium sind der Tabelle zu entnehmen.

	PDH i. % v. total	Glycerin-3-P Bildung μ M/EGluDH	ADP nMol/E GluDH	ATP nMol/E GluDH	$\frac{\text{ATP}}{\text{ADP}}$
Kontrolle N = 12	11,92 + 1,70 ±	-	4,088 +0,356 ±	12,787 + 0,967 ±	3,16 +0,13 ±
mit ATP-Falle N = 18	63,91 + 2,45 ±	1,168 +0,065 ±	6,440 +0,586 ±	8,087 +0,487 ±	1,280 +0,11 ±
mit ATP-Falle Palmityl-CoA 5 μ Mol/L N = 6	42,48 + 2,76 ±	1,149 +0,076 ±	5,75 +0,758 ±	11,21 + 1,32 ±	2,095 +0,27 ±
mit ATP-Falle Palmityl-CoA 20 μ Mol/L N = 9	10,03 + 0,98 ±	0,348 +0,041 ±	3,413 +0,377 ±	10,320 + 0,90 ±	3,214 +0,304 ±

± S.E.M.

Wie der Tabelle 6 zu entnehmen ist, beträgt ohne exogenes Substrat der ATP/ADP Quotient isolierter Fettzellmitochondrien 3,16. Die Zugabe von Glycerin und Glycerokinase als ATP-Falle bewirkt eine signifikante Abnahme des Quotienten auf 1,28.

Der Zusatz von Palmityl-CoA in den Konzentrationen von 5 bzw. 20 μ Mol/L führen zu einem dosisabhängigen Wiederanstieg des ATP/ADP Quotienten.

Wichtig ist, daß die Abnahme des ATP/ADP Quotienten schon bei der niedrigen Palmityl-CoA Konzentration teilweise aufgehoben wird, bei der lediglich die Wirkung des Palmityl-CoAs auf die PDH Interkonvertierung, nicht aber ein Einfluß auf die Glycerin-3-P Bildung zu beobachten war.

3.6 Spezifität der Palmityl-CoA-Wirkung:

3.6.1 Zerstörung des Palmityl-CoA durch alkalische Verseifung

Tabelle 7 zeigt, daß die Zerstörung von Palmityl-CoA durch alkalische Verseifung die Wirkung auf die PDH Interkonvertierung in Fettzellmitochondrien zum Verschwinden bringt.

TABELLE 7: Wirkung von durch alkalische Verseifung zerstörtem Palmityl-CoA auf die Fettzellmitochondrien.

Inkubation wie S.13 angegeben über 5 Minuten. Zusätze wie aus der Tabelle ersichtlich.

Zusätze	PDH _a in % von total	Glycerin-3-P Bildung /uMol/ E GluDH/5 Minuten
ADP 20,uMol/L	80,8	1,33
ATP-Falle	74,4	1,60
	73,6	1,06
	81,8	1,09
ADP 20,uMol/L	20,1	0,49
ATP-Falle	21,7	0,64
Palmityl-CoA	15,0	0,24
20,uMol/L	13,3	0,46
ADP 20,uMol/L	25,6	-
verseiftes Palmityl-CoA		
entsprechend	19,2	-
20,uMol/L der Ausgangs- lösung		
ADP 20,uMol/l	80,0	2,00
ATP-Falle	67,0	1,91
verseiftes Palmityl-CoA	83,3	1,25
(Konzentration wie oben)	83,3	1,09

Während unbehandeltes Palmityl-CoA in Anwesenheit der ATP-Falle die PDH_a von etwa 77 % auf 18 % senkte, blieb der aktive Teil der PDH durch Zusatz von verseiftem Palmityl-CoA unverändert. Daß das verseifte Präparat keine eigene Wirkung auf die PDH Interkonvertierung hat, geht aus der Tatsache hervor, daß es in Abwesenheit der ATP-Falle ebenfalls keine Änderung der PDH hervorruft.

3.6.2 Wirksamkeit von Palmityl-dephospho-CoA:

Außer Palmityl-CoA erwies sich auch Palmityl-dephospho-CoA als wirksam (Tabelle 8). In äquimolaren Mengen führte es zu einer gleichartigen Verminderung der PDH_a Aktivität wie Palmityl-CoA.

TABELLE 8: Wirkung von Palmityl-dephospho-CoA auf die Fettzell-mitochondrien .

Inkubation der Mitochondrien wie S. 13. Zusätze sind jeweils angegeben.

Zusätze	PDH_a in % von total	Glycerin-3-P Bildung μM/ E GluDH/ 7 min
ADP 20 μMol/L ATP-Falle	$45,14 \pm 3,74$	$1,357 \pm 0,091$
ADP 20 μMol/L ATP-Falle Palmityl-CoA 10 μM	$19,86 \pm 2,14$	$0,795 \pm 0,032$
ADP 20 μMol/L ATP-Falle Palmityl-CoA 20 μM	$8,76 \pm 1,17$	$0,462 \pm 0,046$
ADP 20 μMol/L ATP-Falle Palmityl-dephospho-CoA 10 μMol/L	$16,92 \pm 2,47$	$0,981 \pm 0,114$
Glycerin/ADP Glycerokinase Palmityl-Dephospho-CoA 20 μMol/L	$9,02 \pm 1,22$	$0,362 \pm 0,060$

N = 5. + S.E.M.

3.7 Reversibilität der Palmityl-CoA Wirkung

Da Acyl-CoA Verbindungen sehr oberflächenaktiv sind, mußte untersucht werden, ob der beobachtete Effekt ein Artefakt ist, das durch eine Störung der Integrität der mitochondrialen Membran hervorgerufen wurde.

Ein derartiger Wirkungsmechanismus würde allerdings zu irreversiblen Änderungen der mitochondrialen Funktion führen, wohingegen die Acyl-CoA Wirkung reversibel sein müßte, wenn dieser Substanzgruppe eine physiologische Wirkung zukäme.

Der Nachweis der Reversibilität wurde zweifach geführt.

3.7.1 Umkehr der Acyl-CoA Wirkung durch Erhöhung der ADP Konzentration:

In einer dosisabhängigen Reaktion konnte durch Erhöhung der ADP Konzentration im Inkubationsmedium die Palmityl-CoA Wirkung auf die PDH-Interkonvertierung und die ATP-Translokation, gemessen an der Glycerin-3-P Bildung, aufgehoben werden.

Wie der Abbildung 12 zu entnehmen ist, kann die durch die ATP-Falle aktivierte PDH durch Erhöhung der ADP-Konzentration im Inkubationsmedium auf ein Plateau von etwa 81 % der Gesamtaktivität gesteigert werden. In Anwesenheit von Palmityl-CoA konnte durch die Hemmung der Translokase die durch die ATP-Falle ausgelöste PDH-Aktivierung verhindert werden.

Durch Steigerung der ADP-Konzentration wurde diese Wirkung des Palmityl-CoA aufgehoben.

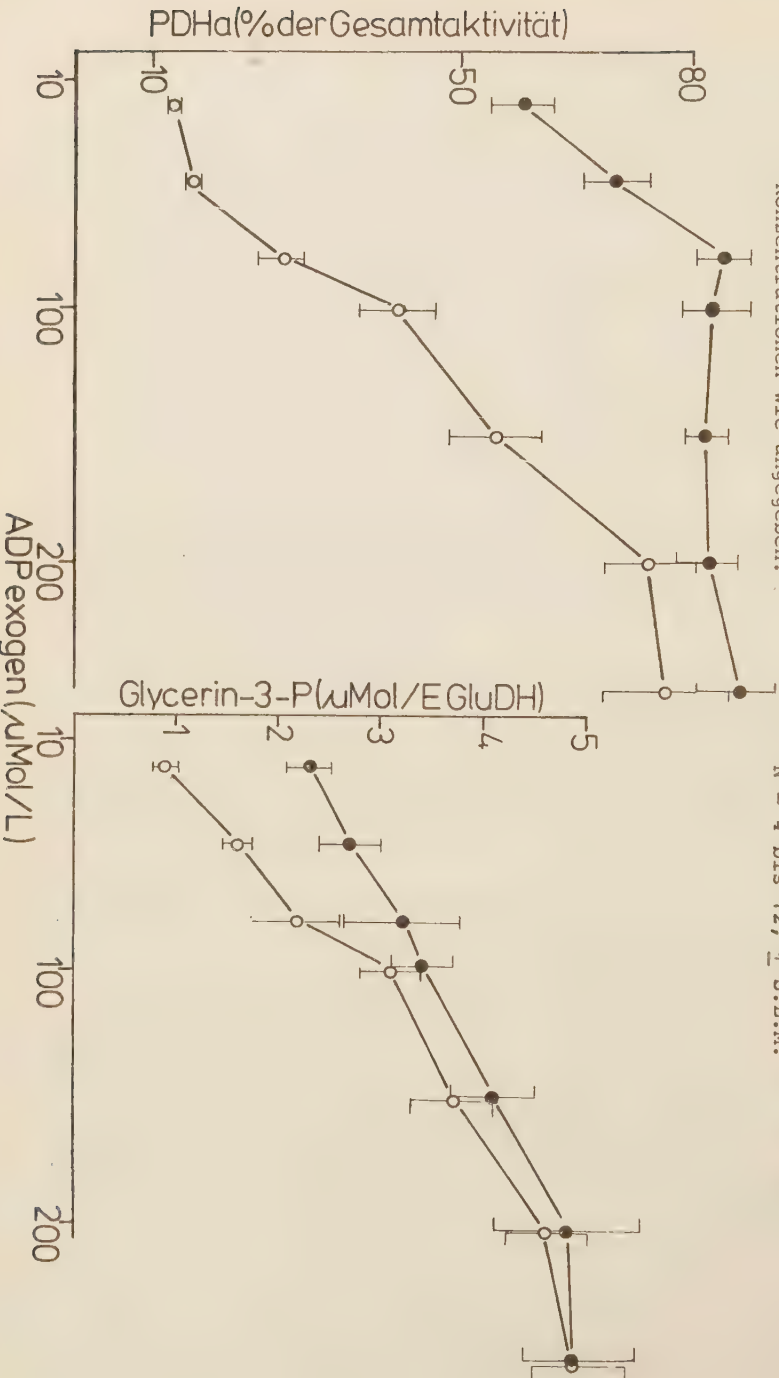
Ab 150 $\mu\text{Mol/L}$ ADP sind die PDH_a -Aktivitäten mit und ohne Palmityl-CoA nicht mehr signifikant voneinander verschieden.

Bei der Glycerin-3-Phosphat-Bildung als Gradmesser der Hemmung des Nukleotidaustrittes wurde die Hemmung durch Palmityl-CoA bereits bei einer ADP-Konzentration von 100 $\mu\text{Mol/L}$ aufgehoben.

ABILDUNG 12: Reversibilität der Palmityl-CoA Wirkung durch Zusatz von ADP:

Vorinkubation der Fettsäuremitchondrien (nicht auf Abbildung) wie S.13 angegeben mit ADP 20 $\mu\text{Mol/L}$, bei den $\bullet$ Werten ohne Palmityl-CoA, bei den $\circ$ Werten mit Palmityl-CoA 20 $\mu\text{Mol/L}$ über 6 Minuten. Danach Inkubation über weitere 6 Minuten mit den ADP Konzentrationen wie angegeben.

N = 4 bis 12, $\pm$ S.E.M.



3.7.2 Aufhebung der Palmityl-CoA Wirkung durch Entfernen des Palmityl-CoA von den Mitochondrienmembranen.

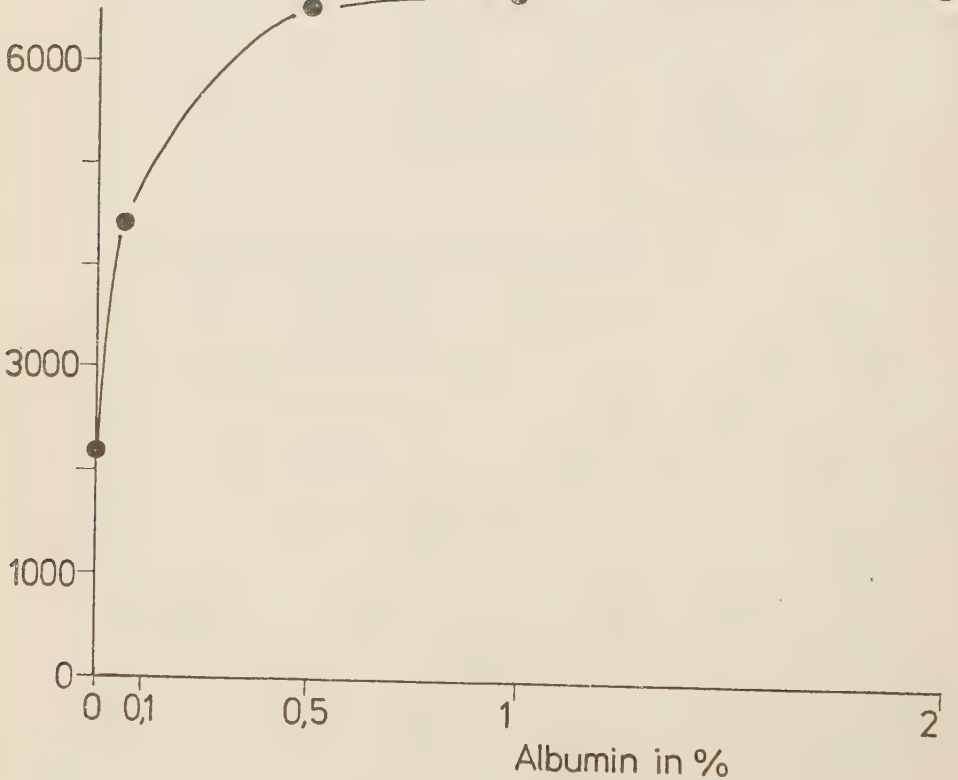
Zur Mitochondriensuspension zugesetztes Palmityl-CoA wird rasch von der Mitochondrienmembran gebunden. Durch Zusatz von Albumin zum Inkubationsmedium gelingt es, gebundenes Acyl-CoA von der Mitochondrienmembran abzulösen. Abbildung 13 zeigt die Konzentrationsabhängigkeit dieses Vorganges.

Dazu wurde dem Inkubationsmedium ^{14}C -Palmityl-CoA zugesetzt, 15 000 cpm/ml. Nach der Inkubation wurden die Mitochondrien abzentrifugiert, wobei das an den Mitochondrienmembranen haftende, d.h. als Translokasehemmer wirksame Palmityl-CoA, im Sediment bleibt. Das im Überstand gemessene ^{14}C -Palmityl-CoA (Messung s.S.23) entspricht dem nicht als Translokasehemmer wirksamen Palmityl-CoA, das an Albumin gebunden ist.

ABBILDUNG 13 Bindung von Palmityl-CoA an Albumin.

Inkubation der Fettzellmitochondrien wie S. 13 angegeben
über 15 Minuten mit ADP 20 μ Mol/L, ATP-Falle
Palmityl-CoA 20 μ Mol/L und markiertem 14 C-Palmityl-CoA
Albuminkonzentration wie angegeben.

Counts/Minute



Durch Erhöhung der Albumin-Konzentration gelang es, die gebundene Radioaktivität wieder in Lösung zu bringen, also gebundenes Acyl-CoA von den Mitochondrien abzulösen.

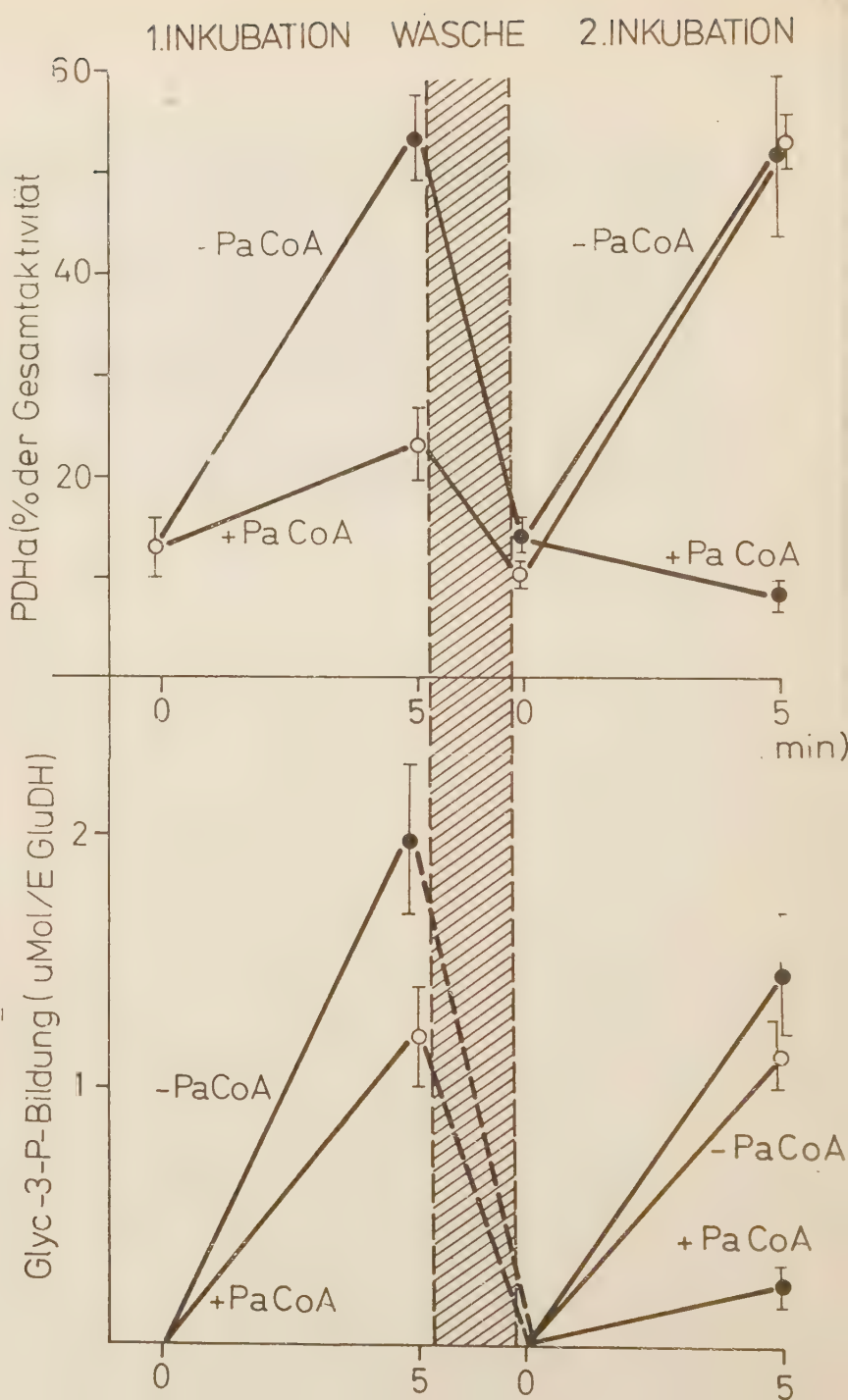
Bei der Konzentration von 0,5 % Albumin im Inkubationsmedium entsprechen die gemessenen Counts/Minute im Überstand bereits über 85 % des gesamten eingesetzten markierten ^{14}C -Palmityl-CoAs. Dieses Verfahren wurde benützt, um die Reversibilität der Acyl-CoA-Wirkung an Fettzellmitochondrien zu demonstrieren.

In Abbildung 14 ist die Aufhebbarkeit der Acyl-CoA-Wirkung durch die Bindung des Acyl-CoAs an Albumin dargestellt.

ABBILDUNG 4: Reversibilität der Palmityl-CoA Wirkung durch die Erhöhung der Albuminkonzentration bei Fettzellmitochondrien.

Inkubation der Fettzellmitochondrien wie S. 13 und im Text angegeben

N = 6, $\pm$ S.E.M.



Im ersten Teil des Experiments (linke Seite) wurden Mitochondrien in Gegenwart der ATP-Falle und $20 \mu\text{Mol/L}$ ADP über 5 Minuten inkubiert. Bei den Kontrollen ohne Palmityl-CoA (•Werte) zeigte sich die Erhöhung der PDH_a Aktivität und ihre Hemmung bei der Inkubation mit $20 \mu\text{Mol/L}$ Palmityl-CoA (o-Werte). Entsprechend diesen Befunden der PDH_a Aktivität (links oben) sind die Werte der Glycerin-3-P-Bildung (links unten) dargestellt. Nach der Inkubation wurden die Mitochondrien abzentrifugiert und in KCL Medium mit 2 % Albumin suspendiert, um das Palmityl-CoA von den Mitochondrien auszulösen. Nach dieser Behandlung zeigten sowohl die PDH_a Aktivität als auch die Glycerin-3-P-Bildung ihre ursprünglichen Werte. Dies erklärt sich dadurch, daß mit der Entfernung des Palmityl-CoA auch die ATP-Falle entfernt wird, die notwendig ist, um die PDH_a Aktivität auf einem hohen Niveau zu halten und die für die Bildung von Glycerin-3-P verantwortlich ist. Für eine zweite Inkubation (rechte Seite der Abbildung) wurden die Mitochondrien wieder genauso inkubiert. Die Mitochondrien ohne Zusatz von Palmityl-CoA in der zweiten Inkubation reagierten auf Zugabe der ATP-Falle sowohl mit PDH Interkonvertierung als auch mit Glycerin-3-P Bildung ungeachtet dessen, ob sie in der ersten Inkubation mit Palmityl-CoA versetzt worden waren oder nicht. Bemerkenswert ist, daß die Wäsche auch die Hemmwirkung des in der zweiten Inkubation zugesetzten Palmityl-CoA auf die Mitochondrien nicht änderte.

Die Reversibilität konnte auch nach längerem Kontakt der Fettzellmitochondrien mit Palmityl-CoA gezeigt werden. Wie aus Tabelle 9 hervorgeht, zeigten die Mitochondrien auch nach einer 60-minütigen Vorinkubation mit Palmityl-CoA nach einer Wäsche mit 2 % Rinderserumalbuminpuffer die gleichen Ansprechbarkeit sowohl hinsichtlich der PDH -Interkonvertierung als auch der Glycerin-3-P-Bildung bei Inkubation mit und ohne Palmityl-CoA.

Da sich ein Detergenseffekt des Palmityl-CoA nach solch langem Kontakt mit den Mitochondrien gezeigt haben sollte, geben diese Versuche einen wichtigen zusätzlichen Hinweis auf die Möglichkeit der physiologischen Bedeutung langkettiger Acyl-CoA Derivate bei der Kontrolle der PDH -Interkonvertierung im Fettgewebe.

TABELLE 9: Aufhebbarkeit der Palmityl-CoA Wirkung auf Fettzellmitochondrien auch nach längerem Kontakt mit Palmityl-CoA.

Fettzellmitochondrien wurden in der ersten Inkubation ohne ATP-Falle mit 20 μ Mol/L Palmityl-CoA wie S. 13 angegeben über verschiedene Zeiten inkubiert, danach nach einer dreimaligen Wäsche mit Albumin nochmals über 5 Minuten inkubiert mit Zusätzen wie angegeben.

N = 6, $\pm$ S.E.M.

1. Inkubation	2. Inkubation mit ATP-Falle und 20 μ mol/L ADP			
	ohne Palmityl-CoA		mit 20 μ mol/L Palmityl-CoA	
	PDH _a % v. total	Glycerin-3-P / μ mol/ E GlUDH	PDH _a % v. total	Glycerin-3-P / μ M/ E GlUDH
7,5 Minuten	53,4 $\pm$ 7,2	1,1 $\pm$ 0,08	8,1 $\pm$ 1,0	0,6 $\pm$ 0,1
15 Minuten	46,6 $\pm$ 7,2	1,4 $\pm$ 0,13	8,3 $\pm$ 1,4	0,5 $\pm$ 0,05
30 Minuten	49,9 $\pm$ 4,4	1,5 $\pm$ 0,16	10,1 $\pm$ 1,7	0,6 $\pm$ 0,1
60 Minuten	47,7 $\pm$ 3,8	1,4 $\pm$ 0,11	14,6 $\pm$ 3,9	0,4 $\pm$ 0,03

W ä s c h e

4. DISKUSSION

In Tabelle 10 ist die Lipogeneserate aus Glukose mit der Aktivität des Pyruvatdehydrogenasekomplexes im Fettgewebe der Ratte verglichen. Es fällt auf, daß sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Insulin beide Parameter in der gleichen Größenordnung liegen. Diese Übereinstimmung legt nahe, daß die PDH Reaktion der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Lipogenese darstellt.

TABELLE 10: Fettsäuresynthese aus Glukose und die PDH Aktivität im Fettgewebe der Ratte: Vergleich der Syntheserate mit der PDH-Aktivität nach Wieland et al. (44).

Fettsäuresynthese in Fettgewebeextrakt

(μ M C₃Äquivalente in Fettsäure
/g Gewebe/Stunde bei 37°C)

-Insulin	+ Insulin	Insulin (mE/ml)	Stimula- tionsfaktor	Literatur
2,25	14,8	1	6,6	(45)
3,60	14,0	430	3,9	(46)
-	10,7	40	-	(47)
0,97	5,6	0,5	5,8	(48)
0,84	16,3	10	19,4	(49)
2,0	13,5	100	6,7	(50)
1,40	6,7	0,1	4,8	(51)

PDH-Aktivität im Fettgewebeextrakt

(μ M Acetyl-CoA/g Gewebe/Stunde bei 37°C)

5,8-9	14,9	10	1,7-2,6	(7)
3,6-3,8	8,9-12,3	1	2,3-3,4	(52)
3,0	3,8	1	1,3	(6) ⁺

⁺PDH-Aktivität gemessen durch die ¹⁴CO₂Freisetzung markierten Pyruvats.

Wieland et al. stellten 1970 (53) fest, daß im Herzmuskel und anderen Geweben diabetischer Ratten durch den Mangel an Insulin

die Aktivität des PDH Komplexes durch die Verschiebung der Interkonvertierung zugunsten der inaktiven Form sehr niedrig ist. Sie vermuteten deshalb, daß Insulin für die Aktivierung der PDH eine wichtige Rolle spielt. In vitro Versuche am Fettgewebe konnten tatsächlich zeigen, daß Insulin den PDH-Komplex in seine aktive Form überführt (54, 5,4). Dieselbe Aktivierung des Enzyms durch Insulin konnte auch an isolierten Fettzellen nachgewiesen werden (13).

Insulin ist nur dann in der Lage, die PDH im Fettgewebe normalgefütterten Ratten zu aktivieren, wenn metabolisierbare Zucker als Substrate dem Inkubationsmedium zugesetzt werden, deren Aufnahme und Abbau durch Insulin beschleunigt wird. Derartige Substrate sind Glukose, Fruktose und Mannose. Kein Insulineffekt tritt dagegen mit Xylose ein, einem im Fettgewebe nicht metabolisierbarem Zucker (13). Wird die Glukoseaufnahme durch 3-O-Methylglukose gehemmt, so verschwindet auch der Insulineffekt (13).

Da mit dem Insulineffekt eine Erhöhung der Glykolyserate verbunden ist, könnte eine Erhöhung des intrazellulären Pyruvatspiegels für eine Aktivierung der PDH verantwortlich sein. Pyruvat selbst beeinflußt die Interkonvertierung der PDH zugunsten der aktiven Form durch Schutz vor dem Angriff der PDH spezifischen inaktivierenden Kinase (21). TAYLOR et al. (55) haben beschrieben, daß in Anwesenheit von Pyruvat Insulin, wenn auch in geringstem Maße, die PDH aktiviert. In eigenen Untersuchungen wurde deshalb die Wirkung von Pyruvat auf die PDH-Aktivität bei Fettzellmitochondrien untersucht. Aus der Tabelle 11 geht hervor, daß man Pyruvatkonzentrationen von 5 mMol/L braucht, um in 20minütiger Inkubation eine geringe Aktivierung von etwa 18-20 % auf 30 % zu erreichen.

TABELLE 11: Wirkung von Pyruvat auf die PDH Interkonvertierung bei Fettzellmitochondrien

Inkubation der Fettzellmitochondrien wie auf S. 12 angegeben über 20 Minuten. Zusätze wie angegeben.

Pyruvat mMol/L	PDH _a in % von total
-	18,5
	17,4
	25,5
0,5	15,0
	15,3
	26,3
1	17,8
	15,3
	20,8
2	23,3
	23,4
	28,2
5	32,4
	25,5
10	28,6
	34,7

Da aus Untersuchungen von BERMAN und HALPERIN (56) hervorgeht, daß die intrazellulären Pyruvatkonzentrationen um 0,33 mMol/L liegen und auch unter Insulineinfluß nur auf etwa 0,46 mMol/L ansteigen, ist eine regulatorische Wirkung des Pyruvats bei der Insulinwirkung unwahrscheinlich.

Um die Möglichkeit zu untersuchen, ob der Insulineffekt auf die PDH Interkonvertierung über das Adenylatzyklasesystem vermittelt wird, setzten WEISS et al. (13) Insulin zusammen mit Noradrenalin der Inkubation von Fettgewebe zu. Wählt man die Insulinkonzentration so, daß die Stimulierung der Lipolyse durch Noradrenalin gerade eben unbeeinflusst bleibt, so bleibt die aktivierende Wirkung von Insulin auf die PDH Interkonvertierung voll erhalten. Dieser Versuch spricht gegen eine Rolle der Adenylatzyklase in der Regulierung der PDH-Interkonvertierung. Zu ähnlichen Ergebnissen kam BRUNNER (57).

Der Mechanismus der PDH-Interkonvertierung (siehe Abb. 2 auf S. 5) legt die Möglichkeit nahe, daß die Insulinwirkung auf einer Änderung des ATP/ADP Verhältnisses in den Mitochondrien beruht. Mit großer Wahrscheinlichkeit ist etwas derartiges für die Wirkung von 2-Desoxyglukose verantwortlich (13). Inkubiert man Fettzellen oder Fettgewebe mit 2-Desoxyglukose als Substrat, findet sich besonders in Anwesenheit von Insulin eine sehr deutliche Aktivierung des PDH-Komplexes, die mit einem Abfall des ATP Gehalts der Fettzelle einhergeht. Zu diesem Abfall kommt es deswegen, weil 2-Desoxyglukose im Fettgewebe zwar noch ATP abhängig phosphoryliert, dann aber nicht mehr weiter metabolisiert werden kann (58).

WIELAND und PORTENHAUSER (16) konnten zeigen, daß an Lebermitochondrien eine Abhängigkeit der PDH Aktivität vom dem Phosphorylierungsgrad der Adeninnukleotide besteht. Wesentlich für die Aktivität der PDH ist das intramitochondriale ATP-ADP Verhältnis (59).

Die Verbindung der Adeninnukleotide vom intramitochondrialen zum übrigen intrazellulären Raum erfolgt über eine spezifische Adeninnukleotidtranslokase (60-68). Diesem Transport durch die Mitochondrienmembran kommt eine zentrale Bedeutung bei der Regulierung des ATP/ADP-Quotienten zu.

Welche Vorgänge ändern den ATP/ADP Quotienten in intakten gekoppelten Fettzellmitochondrien?

Als einfachstes läßt sich eine Änderung dieses Quotienten durch die Zugabe von ADP erreichen. Die dabei zu beobachtende Zunahme der PDH_a ist in Abbildung 7 auf Seite 30 dargestellt. Um das Modell der isolierten Mitochondrien mehr den physiologischen Bedingungen anzupassen, wird dem Inkubationsmedium eine ATP-Falle zugesetzt (siehe Methoden S. 13), die das mitochondrial gebildete ATP unter Bildung von ADP den Mitochondrien entzieht. Die Geschwindigkeit der Glycerin-3-P-Bildung ist dabei ein ungefähres Maß zur Abschätzung der Translokasekapazität. Wahrscheinlich wird die Translokase überschätzt, da unter unseren Bedingungen möglicherweise in geringem Maße für Adeninnukleotid durchlässige Lecke entstehen. In Abbildung 7 wird deutlich, daß durch den ATP Entzug mit der Falle bereits mit einer ADP Konzentration von $20 \mu\text{Mol/L}$, die allein noch nicht die PDH Interkonvertierung beeinflußt, die PDH deutlich aktiviert wird.

Als Modell für die Hemmung der Translokase und der dadurch entstehenden Möglichkeiten der Verschiebung der ATP/ADP Quotienten und dessen Auswirkungen auf die PDH-Interkonvertierung wurde Atractylosid eingesetzt (36-39, 18, 11).

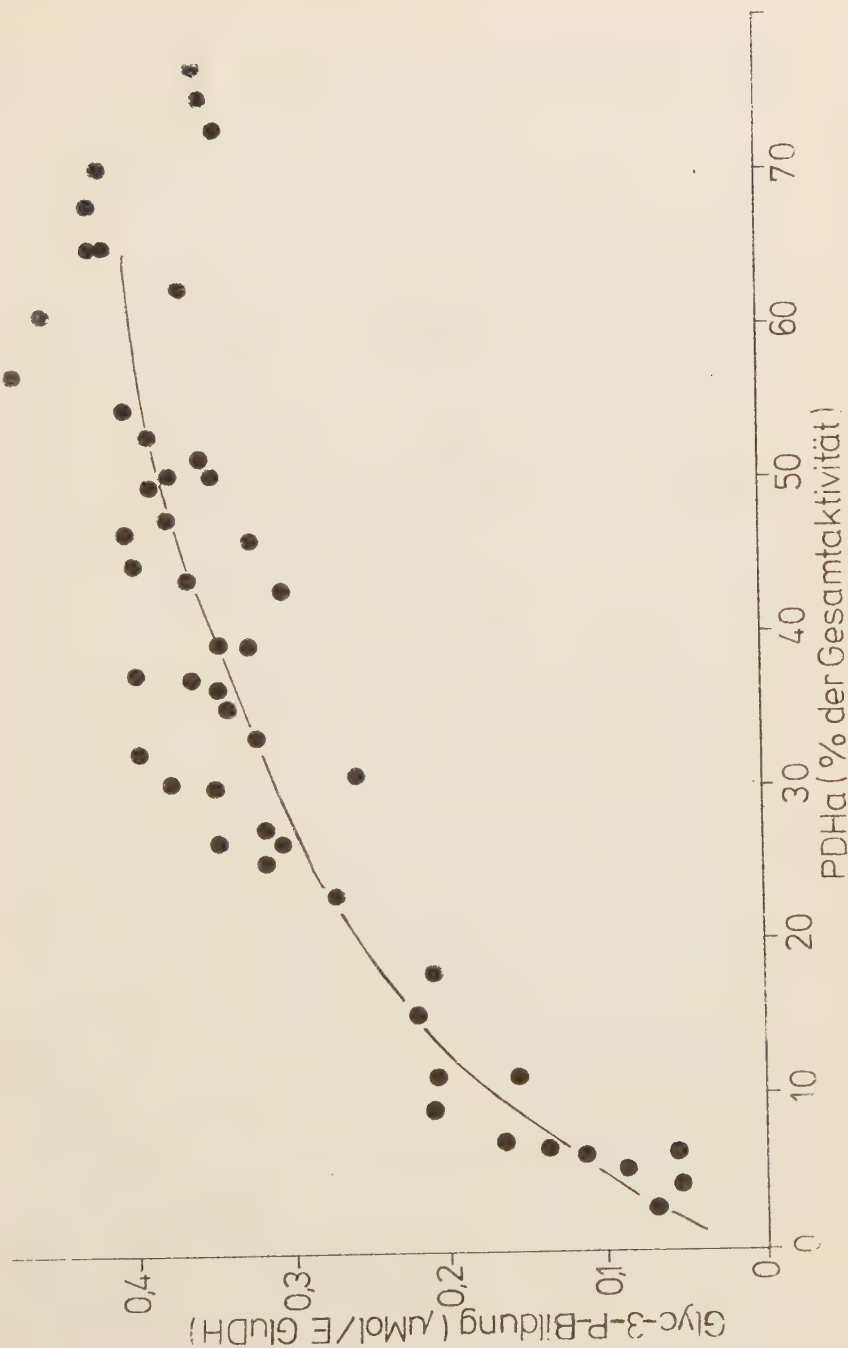
Abbildung 8 auf Seite 31 zeigen die Messungen des Sauerstoffverbrauches der Mitochondriensuspension. Es tritt eine deutliche konzentrationsabhängige Hemmung durch Atractylosid ein. In Anwesenheit der ATP-Falle hemmt Atractylosid dosisabhängig die Translokase, gemessen an der Abnahme der Glycerin-3-P Bildung gegenüber der Kontrolle. Parallel dazu liegt auch die PDH_a Aktivität um so niedriger je höher Atractylosidkonzentrationen zugesetzt werden. In Tabelle 3 auf Seite 33 ist dieser Zusammenhang zwischen der Hemmung der Translokase, ausgedrückt in der Abnahme des O_2 Verbrauches und der Glycerin-3-P-Bildung; und der Interkonvertierung der PDH dargestellt.

Für die physiologische Kontrolle der Adeninnukleotidtranslokaseaktivität spielt das aus *Atractylis gumifera* dargestellte Glykosid natürlich keine Rolle. Von den bei höheren Organismen vorkommenden Translokasehemmstoffen hat zweifellos das langkettige Acyl-CoA die größte Bedeutung, da diese Verbindungsklasse an einer Schnittstelle des Lipidstoffwechsels liegt.

WIELAND et al. (69) beschrieben die Hemmwirkung von Coenzym-A-Thioestern langkettiger Fettsäuren auf wichtige Enzyme an Zweigstellen des Stoffwechsels. Da die wirksamen Konzentrationen dieser Verbindungen im Bereich der Gewebegehalte liegen, kann geschlossen werden, daß den langkettigen Coenzym-A-Estern eine regulatorische Funktion im Stoffwechsel zukommt. Außerdem konnte nachgewiesen werden, daß die intrazellulären Acyl-CoA Spiegel unter hormoneller Kontrolle stehen. So senkt beispielsweise Insulin den Acyl-CoA Gehalt des Fettgewebes (49, 70).

Aus den Untersuchungen an isolierten Fettgewebsmitochondrien geht hervor, daß Palmityl-CoA, das in den vorliegenden Untersuchungen als Coenzym-A Ester einer langkettigen Fettsäure eingesetzt wird, wie Atractylosid wirkt. Eine Substratwirkung des Palmityl-CoAs auf die Interkonvertierung der PDH kann durch die niedrigen wirksamen Konzentrationen schon ab $10 \mu\text{M}$ und den Messungen des Sauerstoffverbrauches (Tabelle 4 auf Seite 35, Abbildung 9 auf Seite 36 und 10 auf Seite 37), der unter Palmityl-CoA Einfluß gehemmt wird, ausgeschlossen werden. In Tabelle 5 auf Seite 40 wird die Wirkung von Palmityl-CoA auf die PDH-Interkonvertierung und die Glycerin-3-P Bildung dargestellt. Palmityl-CoA hemmt dosisabhängig die Glycerin-3-P-Bildung als Maß für die Translokaseaktivität wie auch die PDH Interkonvertierung, indem es im Vergleich zur Kontrolle mit der ATP-Falle die PDH deutlich erniedrigt. In Abb. 15 ist der Zusammenhang zwischen PDH_a Aktivität und Grad der Translokasehemmung gemessen an Glycerin-3-P-Bildung durch Palmityl-CoA dargestellt.

ABBILDUNG 15: Zusammenhang zwischen PDH_a Aktivität und Glycerin-3-P-Bildung
unter Palmityl-CoA Einfluß



Mißt man den ATP/ADP Quotienten unter den obigen Bedingungen (Tabelle 6 auf Seite 42) so wird deutlich, daß Palmityl-CoA nicht nur die Glycerin-3-P Bildung hemmt und die PDH Interkonvertierung beeinflusst, sondern daß diesen Veränderungen parallel eine Änderung des ATP/ADP folgt. Ist durch den Zusatz der ATP-Falle die PDH Interkonvertierung zugunsten der PDH_a verschoben, so liegt auch der ATP/ADP Quotient niedrig. Durch Zusatz von Palmityl-CoA bleibt durch Hemmung der Translokase der ATP/ADP Quotient gegenüber der Kontrolle gleich und die PDH Interkonvertierung wird ebenfalls nicht beeinflusst.

Aus Abbildung 11 auf Seite 39 geht hervor, daß die Hemmwirkung von Palmityl-CoA sofort eintritt und nach spätestens 2 Minuten ihr Maximum erreicht.

Daß in Anwesenheit von exogenem Substrat die PDH-Interkonvertierung trotz der ATP-Falle nicht beeinflusst wird (siehe Tabelle 5 auf Seite 40), kann durch die Annahme erklärt werden, daß im Status 3 die hohe Phosphorylierungsrate in den Mitochondrien größer ist als die Adeninnukleotidtranslokation durch die mitochondriale Membran und deswegen ein hoher ATP/ADP Quotient aufrecht erhalten wird. Palmityl-CoA ist jedoch auch unter diesen Bedingungen wirksam, jedenfalls hemmt es die im Status 3 außerordentlich hohe Glycerin-3-P-Bildung nahezu vollständig.

Wie für andere Prozesse (69) ist für die Acyl-CoA Wirkung auf die PDH-Interkonvertierung die Thioesterbindung essentiell. Wie aus Tabelle 7 auf Seite 44 ersichtlich ist, ist verseiftes Palmityl-CoA wirkungslos. Die sonstige Spezifität ist offensichtlich nicht sehr groß, jedenfalls ist Palmityl-Dephospho-CoA (siehe Tabelle 8 auf Seite 45) ein ebenso guter Hemmstoff.

Ein wichtiger Einwand gegen die physiologische Bedeutung der Acyl-CoA Ester als Regulatoren der Adeninnukleotidtranslokaseaktivität ist, daß sie infolge ihrer Oberflächenaktivität als Detergenzien wirken und so zu irreversiblen Störungen der Mitochondrienmembran führen. Daher war der Nachweis der Reversibilität ihrer Hemmwirkung von besonderer Bedeutung.

Wie die Abbildung 12 auf Seite 48 zeigt, kann durch die Zugabe von ADP die Wirkung des Palmityl-CoAs auf die Interkonvertie-

rung der PDH und die Glycerin-3-P-Bildung aufgehoben werden. Die Werte der PDH_a Aktivität und der Rate der Glycerin-3-P-Bildung erreichen die gleiche Höhe wie ohne Zugabe von Palmityl-CoA.

Wie auf Seite 48 beschrieben, kann das an der Mitochondrienmembran haftende Palmityl-CoA durch Erhöhung der Albuminkonzentration im Inkubationsmedium abgelöst werden. Dies bedeutet, daß mit steigender Albuminkonzentration im Inkubationsmedium das an der Fettzellmitochondrienmembran haftende Palmityl-CoA und damit die Translokasehemmung abnimmt. Diese Eigenschaft des Albumins wurde benutzt, um die Reversibilität der Palmityl-CoA Wirkung zu zeigen.

In Abbildung 14 auf Seite 51 sind die Ergebnisse zusammengestellt. Nach einer Inkubation der Fettzellmitochondrien mit ATP-Falle einmal mit und einmal ohne Zusatz von Palmityl-CoA wird durch Zusatz von Albumin das Palmityl-CoA entfernt. Die Interkonvertierung der PDH zugunsten der PDH_a wird durch das Waschen wieder aufgehoben, da die ATP-Falle nicht mehr wirkt. Setzt man nun wieder eine ATP-Falle zu, so reagieren die Fettzellmitochondrien mit einer Änderung der PDH_a und Glycerin-3-P-Bildung. Dabei spielt es keine Rolle, ob diese Mitochondrien vorher mit Palmityl-CoA versetzt wurden oder nicht. Diese Veränderungen durch die ATP-Falle sind wiederum durch Palmityl-CoA hemmbar. Eine derartige vollständige Reversibilität der Palmityl-CoA Wirkung tritt auch dann noch ein, wenn die Mitochondrien längere Zeit mit Palmityl-CoA in Berührung kommen. In Tabelle 9 auf Seite 53 sind die Mitochondrien nach bis zu 60 minütiger Vorinkubation mit Palmityl-CoA mit einer ATP-Falle inkubiert worden.

Es zeigt sich, daß die ATP-Falle voll wirksam bleibt und keine Hemmung der PDH Interkonvertierung oder Glycerin-3-P-Bildung auftritt.

Messungen der Adeninnukleotide im Fettgewebe haben keinen Abfall des ATP/ADP Quotienten unter Insulinwirkung nachweisen können. Dieser Befund spricht aber nur scheinbar gegen eine durch Änderung des ATP/ADP Quotienten vermittelte Insulinwirkung, da es, jedenfalls was die PDH Interkonvertierung anlangt, nur auf den intramitochondrialen ATP/ADP Quotienten ankommt.

Messungen des Sauerstoffverbrauches im Fettgewebe haben ergeben, daß unter Insulineinwirkung der Sauerstoffverbrauch erhöht ist (71, 72). Dies ist nur verständlich, wenn man annimmt, daß unter Insulinwirkung auch der ATP-Umsatz zunimmt. Die Ursache für den vermehrten ATP-Verbrauch liegt in der Stimulierung cytosolischer Biosynthesevorgänge durch das Hormon. In erster Linie wäre an eine gesteigerte Triglyceridsynthese zu denken, daneben kommt auch die Stimulierung der Proteinsynthese und evtl. die Glykogensynthese in Frage. Nehmen wir an, daß auch in den intakten Fettzellen die Regulierung der PDH Interkonvertierung durch über die Translokaseaktivität vermittelte Regulierung des ATP/ADP Quotienten geschieht, tritt durch Insulin folgendes ein: der Acyl-CoA Spiegel wird durch Insulin gesenkt, da vermehrt Glycerophosphat für die Triglyceridsynthese bereitgestellt wird. Dies bewirkt eine Enthemmung der Translokase, sodaß vermehrt ATP durch die mitochondriale Membran ins Cytosol austreten kann. Als Folge nimmt der ATP/ADP Quotient in den Mitochondrien ab und der Anteil der PDH_a am Gesamt-PDH-Komplex nimmt zu.

5. ZUSAMMENFASSUNG

An isolierten Fettzellmitochondrien von Ratten wurde das Verhalten der Pyruvatdehydrogenaseaktivität im Zusammenhang mit dem Energiestatus der Mitochondrien untersucht. Die Aktivität des Pyruvatdehydrogenase-Enzymkomplexes liegt bei Fettzellmitochondrien, die ohne Zusätze inkubiert werden, niedrig, d.h. der aktive Teil des Enzymkomplexes, die dephosphorylierte Form (PDH_a) beträgt nur wenige Prozent des Gesamtkomplexes. Der intramitochondriale Energiestatus, ausgedrückt im Verhältnis ATP zu ADP beträgt dabei 3:1. Durch Zugabe von ADP zu dem Inkubationsmedium wurde das ATP/ADP Verhältnis geändert. Bei 100 μ Mol/L exogen zugeführtem ADP stieg die Pyruvatdehydrogenase a auf 60 % der Gesamtaktivität. Die intramitochondrialen Adeninnukleotide sind durch eine spezifische Adeninnukleotidtranslokase mit dem restlichen intrazellulären Raum verbunden. Um das Modell der isolierten Mitochondrien mehr den physiologischen Bedingungen anzupassen, wurde dem Inkubationsmedium eine ATP-Falle zugesetzt, die das mitochondrial gebildete ATP unter Bildung von ADP den Mitochondrien entzieht. Die Geschwindigkeit des dabei entstehenden Glycerin-3-P ist dabei ein ungefähres Maß zur Abschätzung der Translokasekapazität. Damit konnte die PDH-Aktivität noch weiter erhöht werden.

Als Modell für die Hemmung der Translokase wurde Atractylosid eingesetzt. Durch Atractylosid wurde die Wirkung der ATP-Falle, gemessen an der Glycerin-3-P-Bildung, dosisabhängig aufgehoben, die PDH-Aktivität war ebenfalls dosisabhängig niedriger verglichen mit den Werten mit ATP-Falle ohne Atractylosid.

Da Atractylosid als physiologischer Regulator nicht in Frage kommt, wurde in den weiteren Versuchen als Translokasehemmer das Palmityl-CoA verwendet, eines der langkettigen Acyl-CoA, die eine physiologische regulatorische Wirkung haben können.

Palmityl-CoA zeigte in den Versuchen die gleiche Wirkung wie Atractylosid. Ebenfalls dosisabhängig erniedrigte es die PDH-Aktivität auf 10 %, die durch Zusatz der ATP-Falle auf über 60 % erhöht worden war.

Direkte Messungen der intramitochondrialen Adeninnukleotide konnten zeigen, daß das ATP/ADP Verhältnis, das bei Zusatz der ATP-Falle auf 1,3 : 1 absank, durch 20 μ Mol/L Palmityl-CoA wieder auf 3 : 1 anstieg. Das gleichzeitige Absinken des aktiven Teils der PDH zeigt den Zusammenhang der PDH-Aktivität mit dem intramitochondrialen Energiestatus.

Diese Wirkung des Palmityl-CoAs auf die PDH Interkonvertierung trat spätestens 20 Sekunden nach Zugabe des Palmityl-CoAs ein.

Die Translokasehemmung durch Palmityl-CoA ist spezifisch an die Thioesterbindung gebunden, alkalische Verseifung hebt die Hemmwirkung auf, Palmityl-DephosphoCoA dagegen ist ein ebenso guter Hemmstoff.

Um der Hemmwirkung physiologische Bedeutung beimessen zu können, wurde die Reversibilität der Palmityl-CoA Wirkung geprüft, da eine Detergenzwirkung diskutiert wurde. Mit exogenem ADP konnte die Palmityl-CoA Wirkung aufgehoben werden, ebenso durch die Entfernung des Palmityl-CoAs von den Mitochondrienmembranen durch Zusatz von Albumin. Dies war auch nach einem längeren Kontakt von Palmityl-CoA mit den Mitochondrien bis zu 60 Minuten möglich.

Da Insulin den Acyl-CoA Spiegel im Cytosol senkt, wäre die Aktivierung der PDH durch das Hormon dadurch zu erklären, daß der erniedrigte Acyl-CoA Spiegel die Translokasehemmung teilweise aufhebt und ATP vermehrt in das Cytosol transportiert wird, wobei der intramitochondriale Spiegel sinkt. Diese Veränderung des intramitochondrialen ATP/ADP Verhältnisses führt zu einer Erhöhung des aktiven Teils des PDH Enzymkomplexes.

o. S U M M A R Y

The activity of pyruvate dehydrogenase in relationship to the energy state of mitochondria was investigated in isolated fat cell mitochondria.

Without any addition, the activity of pyruvate dehydrogenase in fat cell mitochondria, that is, the active form of the enzyme, is only a few percent of the whole enzyme. The energy state in mitochondria, expressed as the relation between ATP and ADP, is 3 : 1.

Addition of ADP to the incubation media led to a change of the ATP/ADP ratio. Addition of 100 μ Mol/l ADP activated the pyruvate dehydrogenase up to 60 percent of the enzyme.

The adenine nucleotides in the mitochondria are connected with the extramitochondrial space by a specific adenine nucleotide translocase. To adapt the fat cell model closer to the physiological conditions an ATP-trap (glycerol plus glycerokinase) was added to the incubation media in order to withdraw the ATP from the mitochondria forming ADP. The rate of the Δ -glycerophosphatate formation is an approximate measurement of translocase activity. The effect of ADP on PDH activation was largely increased in the presence of the trapping system. Atractylate was used as an inhibitor of translocase. The effect of the ATP-trap measured in Δ -glycerophosphatate formation was abolished dose- dependently by atractylate. Correspondingly the activation of PDH was smaller than with the ATP-trap without atractylate.

As atractylate cannot be regarded as a physiological regulator, in further experiments palmitoyl-CoA was used for the inhibition of the translocase. Palmitoyl-CoA has been shown to interact with several important enzymes of carbohydrate and lipid metabolism and therefore may be of physiological importance in cellular control processes.

Palmitoyl-CoA acted similar to atractylate. Dose-dependently it reduced the PDH activity to 10 percent, which was first increased up to more than 60 percent of total activity by the addition of the ATP-trap. Direct measurement of the intra-mitochondrial adenine nucleotide level showed that the ATP/ADP ratio was lowered to 1,3 with the ATP-trap alone and increased to 3 upon addition of 20 μ Mol/l palmitoyl-CoA. The accompanying lowering of the active form of PDH indicates an interrelationship between the state of the PDH system and the mitochondrial energy state.

The effect of palmitoyl-CoA on PDH interconversion could be seen already after 20 seconds after addition of palmitoyl-CoA.

The inhibitory effect of palmitoyl-CoA depends specifically on the thioester bound, the cleavage of which by alkali treatment completely abolished the inhibitory effect. Palmitoyl-desphospho-CoA, on the other hand, was an equally effective translocase inhibitor.

In order to rule out an unspecific detergent-like effect of palmitoyl-CoA the reversibility of its mitochondrial actions was investigated. Reversibility was proved by the following criteria: a) the effect of palmitoyl-CoA could be overcome by increasing the concentration of ADP in the medium, b) removal of palmitoyl-CoA by treatment with serum albumine fully restored the original functions of the mitochondria and c) this was demonstrable even after 60 minutes of preincubation of the particles with palmitoyl-CoA. These results suggest a possible physiological role of palmitoyl-CoA for the regulation of the PDH complex in adipose tissue.

As insulin is known to lower the acyl-CoA level and to activate PDH in adipose tissue, an explanation for the possible interrelationship may be given as follows: the lowered acyl-CoA level results in partial release of the inhibition of translocase thus allowing more ATP to be transported into the cytosol and consequently leading to a drop of the mitochondrial ATP/ADP ratio. This change of the ATP/ADP ratio leads then to the activation of PDH.

7. Literaturverzeichnis

1. Petrides, P., Weiss, L., Löffler, G., und Wieland, O.H., (1971) in Diabetes mellitus, Urban & Schwarzenberg, München, Berlin, Wien, S.12.
2. Wieland, O.H. Siess, E.A., Schulze-Wethmar, F.H., von Funcke H.J., Patzelt, C., (1970) in Biochemie und Klinik des Insulinmangels, Symposium der Forschergruppe Diabetes
3. Jungas, R.L., (1970), Endocrinology 86, 1368-1375.
4. Weiss, L., Löffler, G., Schirmann, A. und Wieland O.H. (1971) FEBS-Lett. 15, 229-231.
5. Denton, R.M., Coore, H.G., Martin, B.R. und Randle, P.J. (1971) Nature New Biol. 231, 115-116.
6. Jungas, R.L. (1971) Metabolism 20, 43 - 53.
7. Coore, H.G., Denton, R.M., Martin, B.R., und Randle P.J. (1971) Biochem.J. 125, 115-127.
8. Wieland, O.H., Siess, E.A., Funcke, H.J.v., Patzelt, C., Schirmann, A., Löffler, G., und Weiss, L., (1972) in: Metabolic conversion of enzymes (Wieland, O.H., Helmreich, E. und Holzer, F., (eds.) Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 293 - 309.
9. Taylor, S.I., Mukherjee, C., und Jungas, R.L., (1973) J.Biol.Chem. 248, 73 - 81.
10. Martin, B.R., Denton, R.M., Pask, H.T., und Randle, P.J. (1972) Biochem.J. 129, 763 - 773.
11. Wieland, O.H., Weiss, L., Löffler, G., Brunner, I., und Bard, S. (1973) in: Metabolic interconversion of enzymes (Fisher, E.H., Krebs, E.G., Neurath, H., Stadtman, E.R. eds.) Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 117 - 129.
12. Sica, V., und Cuatrecasas, P. (1973) Biochemistry 12, 2282 - 2291.
13. Weiss, L., Löffler, G., und Wieland, O.H., (1974) Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 355, 363 - 377.
14. Denton, R.M., und Halperin, M.C. (1968) Biochem.J. 110, 27 - 38.
15. Brunner, I., persönliche Mitteilung.
16. Wieland, O.H., und Portenhauser, R. (1974) Eur.J.Biochem. 45, 577 - 588.
17. Taylor, S.I., Mukherjee, Ch. und Jungas, R.L. (1975) J.biol.Chem. 250, 2028 - 2035.
18. Siess, E.A., und Wieland, O.H., (1975) FEBS-Lett. 52, 226 - 230.

19. Tabor, H., Mehler, A.H. und Stadtmann, E.R. (1953) J. Biol. Chem. 204, 127 - 138.
20. Wieland, O.H., Patzelt, C., und Löffler, G., (1972) Eur. J. Chem. 26, 426 - 433.
21. Siess, E.A. und Wieland, O.H., (1972) Eur. J. Biochem. 26, 96 - 105
22. Lehninger A.L. (1971) in Biochemistry, Worth Publishers, inc. S. 343-346
23. Sachs, L., Angewandte Statistik, 4. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, S. 230 Vergleich zweier unabhängiger Stichproben
24. Krebs, H.A., und Henseleit, K. (1932) Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 210, 33.
25. Rodbell, M., (1964) J. Biol. Chem. 239, 375 - 380.
26. Martin, B.R. und Denton, R.M. (1970) Biochem. J. 117, 861 - 877.
27. Scriba, P. und Holzer, H. (1961) Biochem. Z. 334, 473 - 486
28. Wieland, O.H., Siess, E.A., Schulze-Wethmar, F.H., Funcke, H.J.v. und Winton, B. (1971) Arch. Biochem. Biophys. 143, 593 - 601.
29. Schmidt, E., (1970) in: Methoden der enzymat. Analyse (Bergmeyer, H.U. ed.) Verlag Chemie, Weinheim, Band I; S. 607 - 613.
30. Lamprecht, W. und Trautschold, I. (1970) ibidem Band II S. 2024 - 2032.
31. Jaworek, D., Gruber, W., und Bergmeyer, H.U. (1970) ibidem Band II S. 2051 - 2055
32. Hohorst, H.J., (1970) in: Methoden der enzymat. Analyse (Bergmeyer, H.U. ed.) Verlag Chemie, Weinheim, Band I, S. 1379 - 1383
33. Chance, B. und Williams, G.R. (1956) Adv. Enzymol. 17, 65-134.
34. Rafael, J., Ludolph, H.J. und Hohorst, H.J. (1969) Hoppe Seyler's Z. 350, 1121 - 1131
35. Rafael, J., Wiemer, G. und Hohorst, H.J., (1974) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 341 - 352.
36. Bruni, A., Luciani, S., und Contessa, A.R., (1964) Nature 201, 1219.
37. Klingenberg, M., und Pfaff, E., (1966) in: Regulation of metabolic processes in mitochondrial (Elsevier, Amsterdam) S. 180
38. Pfaff, E., Klingenberg, M. und Heldt, H.W., (1965) Biochim. biophys. Acta 104, 312.
39. Zuurendonk, P.F., und Tager, J.M., (1974) Biochim. Biophys. Acta 333, 393 - 399.
40. Lopez-Cardozo, M., Vaartjes, W.J., Van den Bergh, S.G., (1972) FEBS Lett. 28, No. 3, 265 - 270.

1. Shug, A., Lerner, E., Elson, G., Shargo, E., (1971) Biochem. Biophys. Res. Comm. 43, 557 - 562.
2. McLean, P., Gumaa, K.A., und Greenbaum, A.L., (1971) FEBS-Lett. 17, 345 - 350.
3. Pande, S.V., und Blanchaer, M.C., (1971) J. Biol. Chem. 246, 402 - 411.
4. Wieland, O.H., Siess, E.A., Weiss, L., Löffler, G., Patzelt, C., Portenhauser, R., Hartmann, U. und Schirrmann, A., in Rate Control of Biological Processes, (1973) Cambridge: At The University Press Nr. XXVII
5. Flatt, J.P. und Ball, E.G., (1964) J. Biol. Chem. 239, 675 - 685.
6. Landau, B.R. und Katz, J. (1965) in: Handbook of Physiology, Sect. 5: Adipose Tissue, 253 - 271. Ed. Renold, A.E. und Cahill, G.F. Jr. Washington, D.C.: American Physiological Society.
7. Katz, J. und Regnstad, R., (1966) J. Biol. Chem. 241, 3600 - 3610.
8. Löffler, G. (1967) Habilitationsschrift, Med. Hochschule Hannover.
9. Denton, R.M., und Halperin, M.L. (1968) Biochem. J. 110 27 - 28.
0. Saggerson, E.D. und Greenbaum, A.L. (1970) Biochem. J. 119, 193 - 219.
1. Zaragoza-Hermans, N. und Felber, J.-P. (1972) Eur. J. Biochem. 25 89 - 95.
2. Weiss, L., Löffler, G., Schirrmann, A., und Wieland, O.H. (1971) Fed. Eur. biochem. Soc. Lett. 15, 229 - 231.
3. Wieland, O.H., Siess, E.A., und Schulze-Wethmar, F.H. (1970). First International Symposium on Metabolic Interconversion of Enzymes, S. Margherita Ligure, Abstr. S. 52
4. Jungas, R.L. (1970) Endocrinologie 86, 1368.
5. Taylor, S.I., Mukherjee, C. und Jungas, R.L. (1973), J. Biol. Chem. 248, 73.
6. Bermann, B.G., und Halperin, M.L., (1973) Biochem. J. 134, 885 - 889.
7. Brunner, I., persönliche Mitteilung
8. Coore, H.G., and Randle, P.J. (1964) Biochem. J. 66 - 78
9. Portenhauser, R., und Wieland, O.H., (1972) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1558 - 1559.
0. Brierley, G.P. und O'Brien, R.L. (1965) J. Biol. Chem. 240, 4532.
1. Bruni, A., Contessa, A.R.R. und Scalella, P., (1965) Biochem. Biophys. Acta 100, 1.
2. Pfaff, E., und Klingenberg, M., (1968) Eur. J. Biochem. 6, 66.
3. Pfaff, E., und Klingenberg, M. und Heldt, H.W., (1965) Biochem. Biophys. Acta 104, 312

64. Pfaff, E., Heldt, H.W., und Klingenberg, M., (1969) Eur. J. Biochem. 10, 484.
65. Chapell, J.B., und Crofts, A.R., (1965) Biochem. J. 95, 707.
66. Klingenberg, M., Heldt, H.W., und Pfaff, E., (1969) in: The Energy Level and Metabolic Control in Mitochondria (Tager, J.M., Papa, S., Quagliariello, E., und Slater, E.C. eds.) S.237, Adriatica Editrice, Bari.
67. Duce, E.D., und Vignais, P. (1965) Biochem. Biophys. Acta 107, 184.
68. Winkler, H.H., Bygrave, F.L. und Lehninger, A.L. (1968) J. Biol. Chem. 243, 20.
69. Wieland, O.H., Jagow-Westermann, B.v., und Stukowski, B. (1969) Hoppe- Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 329.
70. Brunner, I., persönliche Mitteilung.
71. Hepp, D., Challoner, D.R., und Williams, R.H. (1968) J. Biol. Chem. 243, 2321.
72. Hepp, D., Challoner, D.R., und Williams, R.H. (1968) J. Biol. Chem. 243, 4020.

Herrn Professor Dr. Otto Wieland bin ich für die Überlassung des Themas sowie für die großzügigen Arbeitsmöglichkeiten in seinem Institut zu Dank verpflichtet.

Ich danke der Deutschen Forschungsgesellschaft, die die Forschungsarbeit ermöglichte, in deren Rahmen die vorliegende Arbeit entstand.

Besonders danke ich auch Herrn Professor Dr. Georg Löffler für die Unterstützung und zahlreichen Ratschläge.

LEBENS LAUF

Sabine Bard geb. Katzschner	geb. am 27.11.1946 in Rinteln als Tochter des Dipl.Volkswirtes Dr. Fritz Katzschner und seiner Ehefrau Margot, geb. Kolkwitz
Schulbildung	Volksschule ab 1953 in Ravensburg Elly-Heuß-Knapp-Gymnasium in Stuttgart-Bad-Cannstatt Abitur 1966
Studium	Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München von 1966 - 1971 Herbst 1971 Abschluß des Staatsexamens
Bestallung als Tierarzt	Februar 1972

